

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

TESE:

**Reatividade a diferentes tipos de estresse em
equinos atletas**

JULIA DIAS VILLAS BOAS

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**Reatividade a diferentes tipos de estresse em
equinos atletas**

JULIA DIAS VILLAS BOAS

Sob a Orientação da Professora
Magda Alves de Medeiros

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Fisiológicas**, no Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas.

Seropédica, RJ
Abril de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

V712r Villas Boas, Julia Dias, 1985-
Reatividade a diferentes tipos de estresse em
equinos atletas / Julia Dias Villas Boas. - 2017.
114 f.: il.

Orientadora: Magda Alves de Medeiros.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Programa Multicêntrico de Pós Graduação em
Ciências Fisiológicas, 2017.

1. Bem-estar animal. 2. Exercício físico. 3.
Sobressalto. 4. Variabilidade da frequência cardíaca.
5. Cortisol. I. Medeiros, Magda Alves de , 1973-,
orient. II Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa Multicêntrico de Pós Graduação em
Ciências Fisiológicas III. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus amados
pais Julio e
Alice por me ensinarem a trilhar os
caminhos da vida e serem meu porto
seguro;
a minha irmã Mariana sempre presente na
minha vida e meu exemplo;
a minha avó Neyde, minha grande
incentivadora;
a meu marido Rafael meu companheiro em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais Julio e Alice e a minha irmã que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

A minha avó Neyde pelas maravilhosas conversas e por sempre acreditar em mim.

Ao meu marido Rafael pelo companheirismo e apoio. E pela ajuda em todas as etapas desse longo caminho trilhado.

A minha orientadora Magda Alves de Modeiros pela oportunidade, confiança e ensinamentos. E, principalmente, pelo carinho e amizade que surgiu ao longo desses anos.

Ao professor Fernando Queiroz pela oportunidade em desenvolver parte da pesquisa na Escola de Equitação do Exército. E, a cima de tudo, pelas idéias, boa vontade e disposição de ajudar em todos os momentos.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Fernanda Godoi, Prof. Márcia Valéria Rizzo, Prof. Maria Fernanda Costa e Prof. David Malvar pela disponibilidade em aceitar nosso convite.

A Dra. Márcia Ramos por ceder os cavalos do Jockey Club Brasileiro para realização do estudo e por acreditar no nosso trabalho. E, a cima de tudo, pela sua grande disponibilidade em ajudar sempre.

Ao treinador Rezinho e ao Marquinhos e por estarem sempre dispostos a ajudar em todos os momentos do trabalho.

A todos da Escola de Equitação do Exército que disponibilizaram os animais e infraestrutura para realização do experimento, e por estarem sempre dispostos a ajudar em todos os momentos do trabalho, em especial ao Sgt. Lima Gomes, Capitão Fabrício e Major Collete.

A todos do Haras Lorien que disponibilizaram os animais e infraestrutura para realização do experimento, e por estarem sempre dispostos a ajudar em todos os momentos do trabalho, em especial a Ivonn Argimon, Dinho e ao Dr. Júlio.

A todos do Itanhangá Golf Club todos do Haras que disponibilizaram os animais e infra-estrutura para realização do experimento, e por estarem sempre dispostos a ajudar em todos os momentos do trabalho, em especial ao Dr. Carlos Alexandre e ao capitão de pólo Ricardo.

Aos professores da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por participarem na minha formação profissional.

A minha querida amiga Marimar que conseguiu disponibilizar seu precioso e escasso tempo para ajudar e dar força durante a parte prática do trabalho.

A amiga Raquel pela realização das análises laboratoriais. E, principalmente, por estar sempre disposta ajudar, em qualquer momento.

Ao cavalo, espécie animal sublime.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

VILLAS-BOAS, Julia Dias. **Reatividade a diferentes tipos de estresse em equinos atletas**. 2017. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

O cavalo tem uma predisposição natural para o esporte, no entanto, o seu uso em competições pode resultar em problemas relacionados ao estresse que prejudicam seu desempenho esportivo e principalmente a sua saúde. Desta forma é fundamental não apenas entender como os diferentes fatores de risco e de resiliência a diferentes estressores influenciam a resposta ao estresse, como também desenvolver estratégias que possam prevenir ou minimizar os efeitos deletérios do estresse. Neste sentido a acupuntura é uma técnica milenar da Medicina Tradicional Chinesa que tem sido utilizada no tratamento e prevenções de doenças relacionadas ao estresse. O presente estudo propôs o uso de dois modelos de estresse: um físico (exercício físico) e outro psicológico (modelo de sobressalto) para verificar a reatividade ao estresse de cavalos atletas. Além disso, também foi avaliado se cavalos de diferentes modalidades esportivas apresentam respostas ao estresse de psicológico distintas e se acupuntura pode alterar as respostas ao estresse físico. No experimento 1, 16 equinos de corrida da raça Puro Sangue Inglês foram submetidos ao exercício a campo de alta intensidade e curta duração (12 m/s, 4min). Os intervalos RR para análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca foram adquiridos através do frequencímetro cardíaco Polar Equine™ e as amostras de sangue foram coletadas antes e, imediatamente, 2h, 4h, 6h, e 24h após o exercício. O exercício promoveu alterações autonômicas no balanço simpato-vagal uma vez que aumentou significativamente o componente de baixa frequência (LF), a frequência cardíaca e a razão LF/HF e diminuiu o componente de alta frequência (HF) ($p < 0.01$). Houve aumento do hematócrito, das proteínas plasmáticas, glicose e lactato plasmático imediatamente após o exercício ($p < 0.001$). Houve aumento ($p < 0.01$) nos valores séricos de cortisol após 30 minutos, retornando aos valores basais após 60min. No entanto, não foi observado diferença significativa nas citocinas plasmáticas IL-1 β e IL-6 entre os momentos após exercício e o momento basal. No experimento 2: os equinos do experimento 1 após o exercício foram aleatoriamente divididos em dois grupos: CTL (C2): Controle (sem manipulação) e ACUP (C2)ACUP (C2): animais submetidos a sessões semanais de acupuntura nos pontos VG1, C7, VG20 e B52 durante 10 semanas. Após o período de tratamento os animais repetiram o mesmo exercício e foram analisados os mesmos parâmetros. A acupuntura reduziu a razão LF/HF, promovendo uma recuperação mais rápida dos animais não apresentando influência nos demais parâmetros analisados. No experimento 3, foram utilizados 24 equinos, pertencentes a três modalidades equestres: Pólo (raça PSI) (n=9), Adestramento (raça Brasileiro de Hipismo) (n=6) e Enduro (Puro Sangue Árabe) (n=9) submetidos ao modelo experimental de sobressalto através da abertura abrupta de um guarda-chuva. Os resultados mostraram que cavalos de enduro apresentaram resposta autonômica induzida pelo sobressalto significativamente menos intensa que cavalos de Polo e Adestramento (menor razão LF/HF no momento do sobressalto), paradoxalmente cavalos de Enduro possuem níveis de cortisol em resposta ao sobressalto mais altos que cavalos de Polo. Não houve diferença entre as modalidades na resposta comportamental após o sobressalto, no entanto cavalos de Pólo apresentam níveis basais de cortisol significativamente mais altos que as demais modalidades e não variaram seus níveis de cortisol em resposta ao estresse. Dessa forma, podemos concluir que 1) o exercício a campo de alta intensidade e curta duração promoveu alterações adaptativas característica de estresse, podendo ser utilizado em estudos de reatividade ao estresse em cavalos de corrida; 2) a acupuntura tem um efeito modulador da resposta autonômica induzida pelo estresse em cavalos atletas e 3) as modalidades equestres de Adestramento, Polo e enduro apresentam reatividade ao estresse distintas.

Palavras-chave: bem-estar animal, exercício físico, sobressalto, variabilidade da frequência cardíaca, glicose, lactato, cortisol, citocinas inflamatórias

ABSTRACT

VILLAS-BOAS, Julia Dias. **Reactivity to different types of stress in equine athletes.** 2017. Biological Sciences and Healthy Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

The horse has a natural predisposition for the sport, however, its use in competitions can result in stress related problems that impair its sporting performance and especially its health. In this way it is fundamental not only to understand how the different risk and resilience factors to different stressors influence the response to stress, but also to develop strategies that can prevent or minimize the deleterious effects of stress. In this sense, acupuncture is an ancient technique of Traditional Chinese Medicine that has been used in the treatment and prevention of stress-related diseases. The present study proposed the use of two models of stress: one physical (physical exercise) and another psychological (startle model) to verify the reactivity to the stress of athletes horses. In addition, it was also evaluated if horses of different sporting modalities present different psychological stress responses and if acupuncture can alter the responses to physical stress. In the experiment 1, 16 Thoroughbred race horses were submitted to a exercise in the field of high intensity and short duration (12 m / s, 4 min). The RR intervals for analysis of the Heart Rate Variability were acquired through the Polar Equine™ heart rate monitor and blood samples were collected before and immediately after 2h, 4h, 6h, and 24h after exercise. The exercise promoted autonomic alterations in the sympatho-vagal balance since it significantly increased the low frequency component (LF), the heart rate and the LF / HF ratio, and decreased the high frequency component (HF) ($p < 0.01$). There was an increase in hematocrit, plasma proteins, glucose and plasma lactate immediately after exercise ($p < 0.001$). There was an increase ($p < 0.01$) in serum cortisol values after 30 minutes, returning to baseline values after 60 min. However, no significant difference was observed in plasma cytokines IL-1 β and IL-6 between moments after exercise and baseline. In experiment 2, horses of the experimental group 1 after exercise were randomly divided into two groups: CTL (C2): Control (without manipulation) and ACUP (C2): animals submitted to weekly sessions of acupuncture at points VG1, C7, VG20 and B52 for 10 weeks. After the treatment period the animals repeated the same exercise and the same parameters were analyzed. Acupuncture reduced the LF / HF ratio, promoting a faster recovery of the animals, showing no influence on the other parameters analyzed. In the experiment 3, 24 equines were used, from three equestrian modes: Polo (PSI) ($n = 9$), Dressage (Brazilian Horse Riding) ($n = 6$) and Endurance ($n=6$) were subjected to the experimental model of startling through the abrupt opening of an umbrella. The results showed that endurance horses presented a significantly less intense startle-induced autonomic response than Polo and Dressage horses (lower LF / HF ratio at the time of the jump), paradoxically Enduro horses have cortisol levels in response in response to the startle than Polo horses. However, there was no difference between the modalities in the behavioral response after the startle, and Polo horses had significantly higher baseline levels of cortisol than the other modalities and did not change their cortisol levels in response to stress. Thus, we can conclude that 1) the exercise in the field of high intensity and short duration promoted adaptive changes characteristic of stress, being able to be used in studies of reactivity to stress in race horses; 2) acupuncture has a modulating effect on the stress-induced autonomic response in athletic horses, and 3) the equestrian modalities of Dressage, Polo and Endurance present different stress reactivity.

Key words: animal welfare, physical exercise, startling, heart rate variability, glucose, lactate, cortisol, inflammatory cytokines

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Apresentação das variáveis referentes de cada animal.....	49
Tabela 2: Localização, inervação e indicação dos pontos de acupuntura utilizados.....	54
Figura 1: Modelo da resposta biológica do animal ao estresse.....	9
Figura 2: Esquema do protocolo experimental de equinos submetidos a exercício a campo.....	20
Figura 3: Fases do protocolo experimental do exercício a campo.....	20
Figura 4: Esquema de tempos de coleta e parâmetros analisados.....	21
Figura 5: Gráfico confeccionado pelo programa Polar Pro Trainer 5®.....	22
Figura 6: Análise da VFC pelo programa HRV analysis.....	23
Figura 7: Curva Padrão das citocinas IL-6 e IL-1 β	25
Figura 8: Efeito do exercício físico a campo na VFC.....	27
Figura 9: Efeito do exercício físico a campo no hematócrito e nas Proteínas Plasmáticas.....	28
Figura 10: Efeito do exercício físico a campo no lactato e na glicose.....	29
Figura 11: Efeito do exercício físico a campo no cortisol.....	30
Figura 12: Efeito do exercício físico a campo nas citocinas inflamatórias.....	31
Figura 13: Efeito do sexo na reatividade de equinos ao exercício.....	32
Figura 14: Efeito da idade na reatividade de equinos ao exercício.....	34
Figura 15: Esquema do protocolo experimental do efeito da acupuntura em equinos submetidos ao exercício a campo.....	50
Figura 16: Localização dos pontos VG20, C7, B5 e VG1 em equinos.....	52
Figura 17: Equino submetido ao tratamento de acupuntura.....	52
Figura 18: Efeito da acupuntura na VFC de equinos submetidos ao exercício a campo.....	54
Figura 19: Efeito da acupuntura no hematócrito de equinos submetidos ao exercício a campo.....	55
Figura 20: Efeito da acupuntura no lactato de equinos submetidos ao exercício a campo.....	56
Figura 21: Efeito da acupuntura na glicose de equinos submetidos ao exercício a campo.....	57
Figura 22: Efeito da acupuntura no cortisol de equinos submetidos ao exercício a campo.....	58
Figura 23: Efeito da acupuntura nas citocinas de equinos submetidos ao exercício a campo.....	59
Figura 24: Esquema ilustrando o posicionamento do cavalo e do guarda-chuva no Modelo Experimental.....	71
Figura 25: Foto sequenciada do modelo experimental de estresse agudo em equinos (através da abertura abrupta de um guarda-chuva).....	72
Figura 26: Esquema do protocolo do modelo experimental de sobressalto em equinos.....	72
Figura 27: Efeito do estresse agudo de sobressalto na VFC de equinos das modalidades Pólo, Adestramento e Enduro.....	77
Figura 28: Efeito do estresse agudo de sobressalto no Cortisol de equinos das modalidades Pólo, Adestramento e Enduro.....	78
Figura 29: Reação comportamental ao modelo de sobressalto de equinos das modalidades enduro, pólo e adestramento.....	79

Figura 30: Comparação do cortisol basal de equinos pertencente as modalidades Enduro), Adestramento (Raça BH), pólo (raça PSI) e Corrida (raça PSI).....104

LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico;
ACUP: Grupo tratado com pontos específicos de acupuntura;
AVP: Vasopressina;
BH: Brasileiro de hipismo
CCP: Corpos Celulares Pré-ganglionares;
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
CRH: Hormônio liberador de corticotropina;
DCF: Departamento de Ciências Fisiológicas;
EA: Eletroacupuntura;
EPM: Erro padrão das médias
FC: Frequência Cardíaca;
FFT: Transformada Rápida de Fourier;
HF: Frequência alta;
HHA: Eixo Hipotálamo Hipófise Adrenal;
IRR: Intervalos cardíacos RR;
LF: Frequência baixa
MTC: Medicina Tradicional Chinesa;
NAV: Nodo Átrioventricular;
NA: Noradrenalina;
NS: Nodo Sinotrial;
PSI: Puro Sangue Inglês
PVN: Núcleo Paraventricular do Hipotálamo;
PTN: Proteína
RMSSD: raiz quadrada da média das diferenças entre intervalos entre batimentos consecutivos elevadas ao quadrado;
SAM: Sistema Simpato-adreno-medular;
SNA: Sistema Nervoso Autônomo;
SNC: Sistema Nervoso Central;
SNP: Sistema Nervoso Parassimpático;
SNS: Sistema Nervoso Simpático;
STDRR: Desvio padrão de todos os intervalos RR do segmento;
VFC: Variabilidade da Frequência Cardíaca.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS	X
SUMÁRIO	1
INTRODUÇÃO GERAL	4
OBJETIVOS	6
Gerais:	6
Específicos:	6
CAPÍTULO I:	7
EFEITO DO EXERCÍCIO A CAMPO DE ALTA INTENSIDADE E BAIXA DURAÇÃO SOBRE OS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE CAVALOS DE CORRIDA	7
RESUMO	7
1.1 INTRODUÇÃO	8
1.2 MATERIAL E MÉTODOS	19
Animais	19
Protocolo experimental	19
Coletas de sangue	21
Uso de Frequencímetros e Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca	21
Análise do Hematócrito	23
Análise das Proteínas Plasmáticas	23
Análise do Lactato	24
Análise da Glicose	24
Análise de Cortisol	24
Análise de Citocinas	25
Análises Estatísticas	26
1.3 RESULTADOS	27

1.3.1 Variabilidade da Frequência Cardíaca	27
1.3.2 Hematócrito	28
1.3.3 Proteínas Plasmáticas	28
1.3.4. Lactato	28
1.3.4 Glicose	29
1.3.5 Cortisol	29
1.3.6 Citocinas	30
1.3.7 Efeito do sexo na reatividade ao estresse físico	31
1.3.8 Efeito da idade na reatividade ao estresse físico	33
1.4 DISCUSSÃO	35
1.5 CONCLUSÃO	42
CAPÍTULO II:	43
EFEITO DA ACUPUNTURA NA RESPOSTAS DE ESTRESSE E NO DESEMPENHO DE CAVALOS DE CORRIDA SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO DE ALTA INTENSIDADE E BAIXA DURAÇÃO	43
RESUMO	43
2.1 INTRODUÇÃO	44
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	48
Animais	48
Protocolo experimental	48
Tratamentos	50
Coletas de sangue	53
Uso de Frequencímetros e Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca	53
Análise do Lactato e Glicose	53
Análise de Cortisol	53
Análise de Citocinas	53
Análises Estatísticas	53
2.3 RESULTADOS	54
2.3.1 VFC	54
2.3.2 Hematócrito	55
2. 3.2 Lactato	56
2.3.3 Glicose	56

2.3.4 Cortisol	57
2.3.5 Citocinas	58
2.4 DISCUSSÃO	60
2.5 CONCLUSÃO	65
CAPÍTULO III	66
RESPOSTAS FISIOLÓGICAS AO MODELO EXPERIMENTAL DE SOBRESSALTO EM EQUINOS ATLETAS DAS MODALIDADES ADESTRAMENTO, ENDURO E PÓLO.	66
RESUMO	66
3.1 INTRODUÇÃO	67
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	70
Animais	70
Protocolo experimental	70
Uso de Frequencímetros e Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca	73
Coletas de sangue	73
Análise de Cortisol	73
Análise Comportamental	74
Análises Estatísticas	74
3.3 RESULTADOS	76
3.3.1 Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca	76
3.3.2 Análise do Cortisol	77
3.3.3 Análise do Comportamento: Teste de Reatividade	78
3.4 DISCUSSÃO	80
3.5 CONCLUSÃO	84
4. CONCLUSÕES GERAIS	85
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
6. ANEXOS	104
6.1. Avaliação da diferença de cortisol basal entre as raças de equinos pertencentes a modalidades Enduro, Adestramento, Pólo e Corrida	104

INTRODUÇÃO GERAL

O cavalo tem uma predisposição natural para o esporte, no entanto, o seu uso em competições frequentemente resulta em vários problemas relacionados ao estresse que direta ou indiretamente influenciam seu desempenho esportivo e produzem efeitos deletérios a sua saúde. A resposta ao estresse é iniciada quando um estímulo (o estressor) é percebido como uma ameaça potencial, resultando numa combinação de respostas biológicas projetadas para aliviar os efeitos do estressor percebido. O estresse pode ter efeitos positivos e negativos sobre o corpo, ajudando o animal a lidar com os estressores rotineiros de curto prazo que em algumas circunstâncias podem melhorar o desempenho, mas em outros, pode prejudicar o desempenho.

Dada a importância econômica e a repercussão que o estresse representa atualmente na medicina veterinária, tem se dado uma atenção cada vez maior ao estudo do estresse em animais domésticos. A redução do estresse é necessária para prevenir doenças, garantir o bem-estar animal e minimizar as perdas econômicas. Neste sentido, tem sido bem reconhecido que os indivíduos apresentam grande variabilidade nas respostas comportamentais e fisiológicas ao estresse. A sensibilidade e a reatividade individual ao estresse são, portanto, importantes na etiologia e manutenção de patologias relacionadas ao estresse. Modelos de reatividade ao estresse são importantes ferramentas para estudar os fatores de risco e de resiliência que podem afetar as respostas de estresse e suas consequências para o indivíduo. No entanto, poucos modelos de estresse podem ser utilizados em equinos. Portanto, estudos mais detalhados a respeito da fisiologia do estresse, bem como o maior conhecimento dos processos metabólicos que ocorrem no cavalo atleta são fundamentais, já que o cavalo atleta é constantemente submetido a situações de estresse.

Os estímulos que desencadeiam respostas de estresse podem ser divididos em predominantemente físicos como a perda de sangue, infecção, frio, dor e exercício físico e predominantemente psicológicos/neurogênicos como o conflito social e a imobilização. Os mecanismos fisiológicos responsáveis pela resposta a estressores psicológicos/neurogênicos e físicos podem ser comuns ou diferenciados. Enquanto estressores físicos, exigem uma imediata reação "sistêmica", que é desencadeada por mecanismos mais reflexos, estressores psicogênicos envolvem experiência prévia ou programas inatos. Estas respostas podem envolver processamento na parte frontal do cérebro e podem ocorrer em antecipação ou em reação a eventos estressantes. O estudo de como o organismo responde a diferentes tipos de estímulo e como estas respostas podem ser moduladas é de suma importância para a busca de estratégias na prevenção dos efeitos deletérios do estresse.

Neste sentido, o presente estudo propõe estudar as respostas autonômicas, comportamentais e endócrinas em dois modelos de reatividade ao estresse em equinos: um estímulo predominantemente psicológico (teste de sobressalto) e um predominantemente físico (exercício físico). As reações de sobressalto em equinos têm interesse especial, pois podem ser influenciados por diferentes manipulações, se tornando uma ferramenta útil para medir o estresse e avaliação de bem-estar. Além disso, teste de sobressalto tem sido combinada com outras medidas para prever temperamento em cavalos. O exercício físico representa o estímulo estressante mais

fisiológico que existe, pois submete o organismo a desafios temporários na sua homeostasia. O exercício físico provoca alterações adaptativas físicas, neurológicas, metabólicas, cardiovasculares, endócrinas e psíquicas no organismo que estão diretamente relacionadas com o tipo de esforço, submáximo prolongado ou máximo de curta duração. A compreensão da fisiologia do exercício é fundamental para avaliação de programas de treinamento que contribuem para adaptação de atletas da espécie equina aos fatores estressantes presentes numa atividade esportiva. Neste sentido, a realização de testes a campo para avaliar as respostas fisiológicas induzidas pelo exercício pode ser uma valiosa ferramenta visto que estes testes fornecem parâmetros clínicos e metabólicos capazes de dar informações relativas à capacidade adaptativa dos equinos frente ao exercício e conseqüentemente a reatividade dos animais ao estímulo.

Em vista da necessidade de melhorar a qualidade de vida e o bem-estar animal (equilíbrio físico e mental) e conseqüentemente melhorar o desempenho atlético é fundamental o desenvolvimento de estratégias para minimizar os efeitos do estresse. Desta forma, cada vez mais tem se buscado alternativas terapêuticas para diminuir as reações deletérias ao organismo ocasionadas pelas respostas aos estímulos estressores. Isso ocorre, porque os medicamentos convencionalmente utilizados para distúrbios decorrentes do estresse produzem diversos efeitos colaterais indesejados. No cavalo atleta o uso de medicamentos deve ser avaliado com maior cautela ainda porque pode ser considerado *dopping*. Vale lembrar que a administração de qualquer substância em cavalos que possa modificar seu desempenho durante uma prova desportiva é considerada *dopping*. Nesse sentido, estudos sobre os efeitos da acupuntura e sua aplicação clínica no tratamento e prevenção do estresse são de interesse.

A acupuntura, prática fundamental da Medicina Tradicional Chinesa, é uma técnica milenar utilizada no tratamento e prevenções de doenças, tendo como objetivo auxiliar o retorno do corpo a seu estado de equilíbrio, através de estímulos de pontos específicos do corpo. Esta terapia vem sendo utilizada amplamente em casos de alterações comportamentais e físicas decorrentes do estresse em humanos e, mais recentemente, também em animais.

Diante do exposto, o presente estudo teve o objetivo de verificar a reatividade de cavalos atletas a estressores físicos e neurogênicos/psicológicos através da avaliação de diversas respostas fisiológicas e verificar se a acupuntura pode modular estas respostas. Além disso, também foi proposto avaliar como as modalidades esportivas podem influenciar essas respostas. Assim, a tese será dividida em três capítulos, no qual o primeiro capítulo aborda o exercício físico como modelo de estresse físico verificando o efeito do exercício a campo de alta intensidade e baixa duração sobre a variabilidade da frequência cardíaca, hematócrito, proteínas plasmáticas, glicose, lactato, cortisol e citocinas inflamatórias. O segundo avalia o efeito da acupuntura na reatividade ao estresse de cavalos atletas utilizando o modelo do capítulo anterior. E o terceiro capítulo, compara a reatividade ao estresse no modelo experimental de sobressalto de cavalos de diferentes modalidades (Adestramento, Enduro e Pólo) pela avaliação da variabilidade da frequência cardíaca, do cortisol e do comportamento.

OBJETIVOS

Gerais:

- Estudar a reatividade ao estresse equinos atletas através da avaliação de parâmetros endócrinos, autonômicos e comportamentais.
- Estudar o efeito da acupuntura reatividade ao estresse equinos atletas.

Específicos:

- Estudar a reatividade ao estresse físico em cavalos de corrida através da avaliação das respostas na variabilidade da frequência cardíaca, no hematócrito, nas proteínas plasmáticas, na glicose, no lactato, no cortisol e nas citocinas inflamatórias induzidas pelo exercício a campo de alta intensidade e baixa duração.
- Verificar o efeito do tratamento crônico por acupuntura na reatividade ao estresse físico em cavalos de corrida através da avaliação das respostas na variabilidade da frequência cardíaca, hematócrito, glicose, lactato, cortisol e citocinas inflamatórias induzidas pelo exercício a campo de alta intensidade e baixa duração.
- Comparar a reatividade ao estresse neurogênico de cavalos atletas de diferentes modalidades equestres (Pólo, Enduro e Adestramento) através da avaliação das respostas endócrinas (análise de Cortisol), autonômicas (análise de Variabilidade da Frequência Cardíaca) e comportamentais induzidas pelo modelo experimental de sobressalto.

CAPÍTULO I:

EFEITO DO EXERCÍCIO A CAMPO DE ALTA INTENSIDADE E BAIXA DURAÇÃO SOBRE OS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE CAVALOS DE CORRIDA

RESUMO

Apesar do exercício físico ser uma forma importante de tratamento e prevenção de algumas doenças, o exercício agudo é considerado uma ferramenta eficaz para estudar as respostas fisiológicas ao estresse metabólico, uma vez que induz respostas neuroendócrinas e autonômicas características de estresse. O objetivo do presente estudo propõe um protocolo de exercício físico (corrida a campo de alta intensidade e curta duração) como modelo de estresse físico em cavalos de corrida. A pesquisa foi realizada no Jockey Club Brasileiro, Rio de Janeiro, Brasil. Foram utilizados 16 equinos da raça Puro Sangue Inglês, com idade entre 3 e 6 anos, experientes em provas de corrida. O exercício foi realizado a campo em pista de areia de 2.040m, e consistiu num aquecimento numa distância de 1,020m a trote e galope curto (4 m/s) seguido de um galope a 12m/s, numa distância de 3,060m por 4 minutos, totalizando uma volta e meia na pista. Dados da Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC) foram adquiridos utilizando o frequencímetro cardíaco Polar Equine™ e as amostras de sangue foram coletadas antes e, imediatamente, 2h, 4h, 6h, e 24h após o fim do exercício. O exercício promoveu aumento do tônus simpático em relação ao parassimpático com aumento significativo da frequência cardíaca, do componente de baixa frequência (LF), e da razão LF/HF e diminuição do componente de alta frequência (HF) em cavalos de corrida treinados ($p < 0.01$). O exercício também promoveu aumento do hematócrito, das proteínas plasmáticas, da glicose e do lactato plasmático imediatamente após o exercício ($p < 0.001$), com retorno dos valores 30 minutos após o exercício ($p < 0.001$). Houve aumento ($p < 0.01$) nos valores séricos de cortisol após 30 minutos após o exercício, retornando aos valores basais após 60 min. No entanto, não foi observado diferença significativa nas citocinas plasmáticas IL-1 β e IL-6 entre os momentos após exercício e o momento basal. Podemos concluir que o exercício físico de alta intensidade e curta duração proposto foi capaz de promover alterações fisiológicas, podendo ser utilizado em pesquisas futuras para discutir a reatividade dos animais a este tipo de estresse e para buscar estratégias que possam minimizar os possíveis efeitos deletérios deste estímulo em cavalos.

Palavras-chave: estresse, variabilidade da frequência cardíaca, glicose, lactato, cortisol, citocinas inflamatórias

1.1 INTRODUÇÃO

O estresse é uma situação gerada por um desafio a qual um organismo está submetido, segundo Selye (1936). Nas condições de estresse, o organismo reage por meio da ativação e desativação de mecanismo de controle de várias funções para recuperar e manter a homeostase. Dessa forma, a resposta a um estímulo estressor é fundamental para homeostase de um ser vivo e sua sobrevivência. No entanto, essas respostas podem ser insuficientes para restabelecer ou manter a homeostase ou podem ser exageradas, representando risco de doenças. Portanto, o estresse pode ser definido como a soma de respostas físicas e mentais causadas por determinados estímulos externos e que permitem ao indivíduo superar determinadas exigências do meio-ambiente (FRANCI, 2005).

O termo estresse tem sido usado como as reações que a acompanham situações de ameaça ou desafio. No entanto, nem todas as reações de estresse são negativas. Uma certa quantidade de estresse é realmente necessária para a sobrevivência. A reação de estresse maximiza o gasto de energia que ajuda a preparar o corpo para atender a uma situação ameaçadora ou desafiadora e que o indivíduo tende a mobilizar um grande esforço a fim de lidar com o evento. Entretanto, enquanto uma certa quantidade de estresse é necessário para a sobrevivência, o estresse prolongado pode afetar adversamente a saúde (BERNARD & KRUPAT, 1994).

Os cavalos respondem a uma mesma situação de formas diferentes. Dessa forma, o que pode ser estressante para um não pode ser para outro. O estresse pode ser provocado por numerosos fatores e três fatores principais determinam se uma situação é percebida como estressante. A primeira é a experiência individual. As situações novas são muitas vezes percebidas como sendo ameaçadoras ou estressante e os cavalos parecem temer o desconhecido. Em segundo lugar, é a sensação de controle que o indivíduo tem em uma situação. Estar fora de controle é um estressor importante para alguns tipos de personalidade. Em terceiro lugar estão exercício físico, doença e dor (CAYADO et al, 2010).

Moberg (2000) propõem um modelo para compreensão do estresse em toda espécie animal, seja nos seres humanos ou em animais. O modelo de estresse animal desenvolvido (Figura 1) sugere uma resposta biológica ao estresse a partir de três estágios gerais:

- 1º) O reconhecimento de um estímulo estressante
- 2º) A defesa biológica contra o estímulo estressante
- 3º) As consequências da resposta de estresse

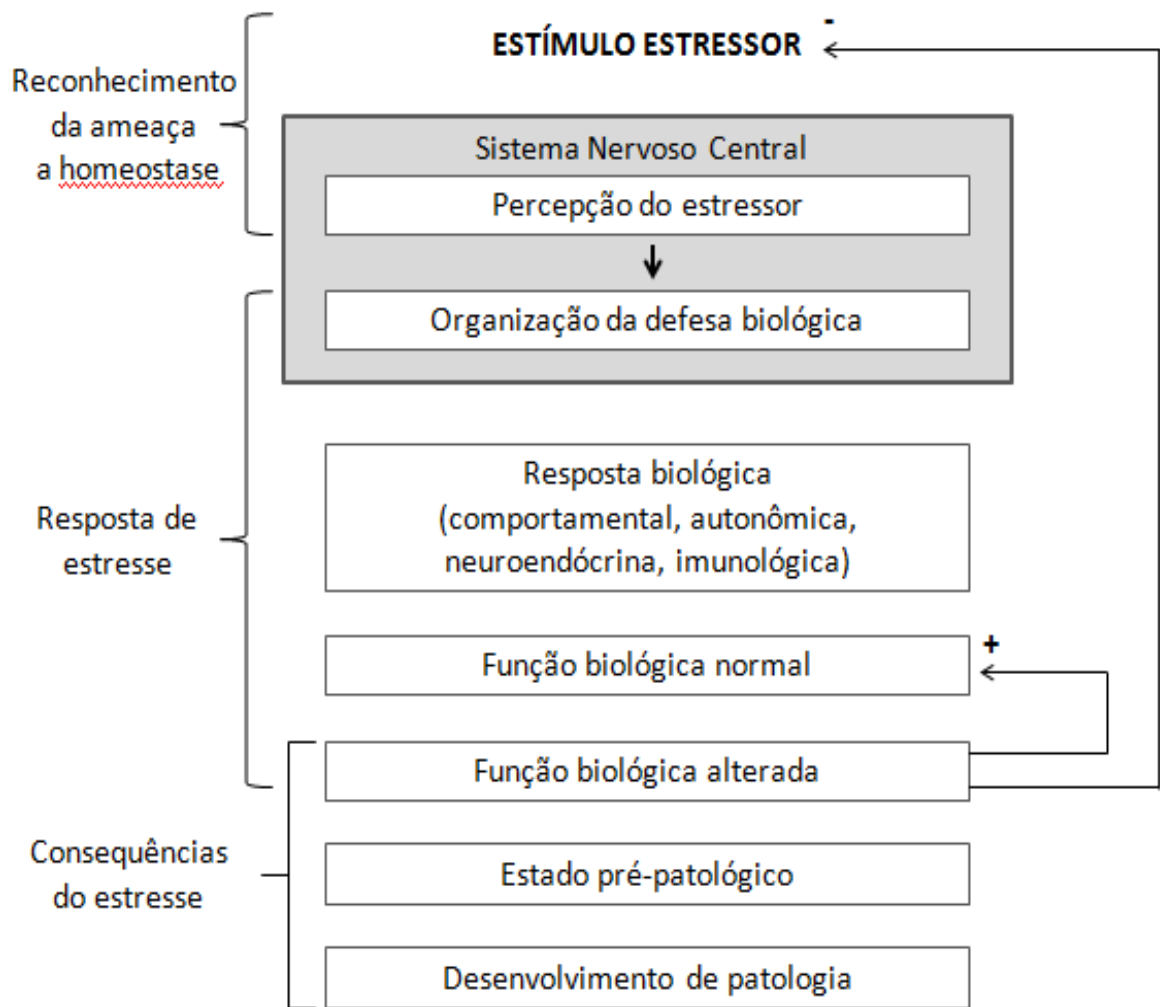


Figura 1: Modelo da resposta biológica do animal ao estresse (MORBEG, 2000)

A resposta ao estresse começa com a percepção de uma ameaça potencial (estímulo estressante) a homeostase pelo SNC. Uma vez que o SNC percebe uma ameaça, o organismo desenvolve uma resposta biológica ou defesa que consiste numa combinação de três respostas gerais de defesas biológicas: resposta comportamental, resposta do sistema nervoso autônomo e resposta do sistema neuro-endócrino.

Este conjunto de respostas do organismo causa mudanças biológicas significantes no animal para aliviar a ameaça percebida. A intensidade da resposta é o que determina se o animal está sofrendo de estresse ou é meramente experimentado um episódio breve em sua vida sem nenhum impacto significativo ao seu bem-estar.

Em situações de estresse, ocorre a ativação de duas principais vias: o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), pelo aumento da produção de cortisol e o sistema nervoso simpático, através da liberação de catecolaminas (noradrenalina/ adrenalina).

A desregulação de um desses sistemas de estresse pode levar a distúrbios fisiológicos de outros sistemas, como os sistemas imunológico e cardio vascular, função metabólica e comportamento, que pode resultar em uma má adaptação da resposta ao

estresse (MARQUES et al, 2010). Segundo, Devries e colaboradores (2007), distúrbios de comportamento e estresse são umas das principais causas de doenças, lesões e morte em equinos. O aumento da incidência de doenças em animais com estresse pode ser atribuído a supressão de seu sistema imunológico. Um dos exemplos mais citados é o aumento da incidência de doenças respiratórias em cavalos transportados, que é atribuído a uma supressão do sistema imune causado pelo estresse de transporte (BLECHA, 2000). O estresse fisiológico e transporte são citados como fatores de risco para o surgimento de úlceras gastroduodenais em equinos, sendo que a prevalência e a gravidade destas são maiores em animais de alto desempenho.

O início da resposta ao estresse pode ser causado por estímulos predominantemente físicos ou predominantemente psicológicos (KEELING & JENSEN, 2002). Independente da causa, as respostas de estresse são bem descritas em equinos e inclui elevadas frequências respiratória e cardíaca, aumento da temperatura corporal e da pressão arterial e de expressão facial típica entre muitos outros sinais comportamentais específicas (DOBROMYLSKYJ et al., 2000; RIETMANN et al., 2004).

O exercício físico representa o estímulo estressante mais fisiológico que existe, pois submete o organismo a desafios temporários a sua homeostasia (CAYADO et al., 2006). Quando o esforço físico torna-se sistemático e contínuo, com aumento gradual da intensidade, intercalado a períodos de repouso, é denominado treinamento, sendo que o maior objetivo deste processo é provocar adaptações fisiológicas que aprimorem o desempenho atlético (GRAAF- ROELFSEMA et al., 2007).

O termo estresse descreve o estado de um organismo sob influência de fatores externos e internos, que ameaçam ou alteram a homeostase. Uma vez que certo limiar de esforço físico for ultrapassado, ocorrerá efeito sistêmico com envolvimento do sistema nervoso periférico e central, e especialmente o sistema nervoso autônomo simpático e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) são ativados (GRAAF-ROELFSEMA et al., 2007). A sensibilização do eixo HHA libera cortisol, principal glicocorticoide, que controla largo espectro de funções metabólicas. Dentre elas, destaca-se o metabolismo energético por meio da gliconeogênese, sendo que este hormônio inibe a utilização de glicose pelos tecidos, priorizando a mobilização para o sistema nervoso central (SNC) e permitindo que, durante o exercício, a glicemia permaneça constante. Além disso, o organismo responde a diferentes sinais circadianos, neurosensoriais, sanguíneos e límbicos (CHROUSOS, 2004). Esses sinais incluem citocinas produzidas por reações inflamatórias imunomediadas, tais como interleucina 1 (IL-1) e Interleucina 6 (IL-6). As duas citocinas pró-inflamatórias ativam o eixo HPA independentemente, bem como em combinação (IMURA et al., 1991), conduzindo indiretamente através da secreção de glicocorticóides para limitação da reação inflamatória. Por outro lado, a IL-6 podem estimular a produção de proteínas de fase aguda e restringir a extensão da resposta inflamatória através do aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias (NIEMAN et al., 1997, PEDERSEN et al., 2000).

Dessa forma, exercício físico provoca alterações adaptativas físicas, neurológicas, metabólicas, cardiovasculares, endócrinas e psíquicas no organismo as quais estão diretamente relacionadas com o tipo de esforço, submáximo prolongado ou máximo de curta duração. A compreensão da fisiologia do exercício é fundamental para avaliação de programas de treinamento que contribuem para adaptação de atletas da

espécie equina aos fatores estressantes presentes numa atividade esportiva (FERRAZ, 2007). Diversos estudos abordam a complexidade da fisiologia do exercício e o processo inflamatório por ele gerado, no entanto a maioria destes relata a ocorrência apenas em animais submetidos a simulações em esteiras ou exercícios de longa duração, como o enduro (HINES et al., 1994; LIBURT et al., 2010; DONOVAN et al., 2007).

As pesquisas a campo se assemelham mais as condições da competição, além disso de apresentar a vantagem de não precisar de tempo para aclimatização dos animais. Segundo Marlin & Nankervis (2002), os testes de desempenho a campo são mais específicos e realistas, principalmente se forem similares às condições da competição. Essa idéia é reforçada por Van Erck e colaboradores (2007) que afirmam que a avaliação de um cavalo a campo possui a vantagem de recriar condições familiares de exercício similares àquelas encontradas durante sessões de treinamento e competições. No entanto, essas vantagens podem dificultar a padronização do teste (BARLY et al., 2004).

O campo da fisiologia do exercício tem como objetivo principal avaliar o desempenho atlético por meio da determinação da dinâmica de variáveis fisiológicas, como frequência cardíaca e variabilidade da frequência cardíaca, limiar de lactato, hematologia e as respostas endócrinas.

Em situações estressantes, ocorre uma alteração do equilíbrio do sistema autonômico, no qual a atividade do sistema simpático domina os efeitos do componente parassimpático (BASELLI et al., 1987, GILL, 2003). Um aumento do componente simpático leva a secreção de epinefrina e norepinefrina, que acelera a frequência cardíaca (DEMPSEY & COOPER, 1969).

A atividade e o equilíbrio do sistema autonômico podem ser analisados através da variabilidade do ritmo sinusal (variabilidade da frequência cardíaca, VFC ou variabilidade do intervalo cardíaco, VIC). Dentre as técnicas utilizadas para avaliação do Sistema Nervoso Autônomo, a VFC tem emergido como uma medida simples e não invasiva dos impulsos autonômicos, representando um dos mais promissores marcadores quantitativos do balanço autonômico.

Mudanças nos padrões da VFC fornecem um indicador de comprometimento da homeostase/equilíbrio (VANDERLEI et al., 2009). A VFC foi utilizada para definir o bem-estar e quantificar o grau de estresse psicológico em cavalos submetidos a várias estímulos, incluindo treinamento inicial (FOWLER et al., 2012; LOFTUS et al., 2016; SCHMIDT et al., 2010; JANCZAREK et al., 2013; MUNSTERS et al., 2013a), dessensibilização a estímulos alarmantes (MUNSTERS et al., 2013b), competição (LEWINSKI et al., 2012; KINNUNEN et al., 2006), testes de objetos novos/sobressalto (VILLAS-BOAS, 2015; VISSER et al., 2002), transporte (SCHMIDT et al., 2010, SCHMIDT et al., 2013; GODOL et al., 2014) e mudança súbita para estábulo individual (ERBER et al., 2013).

A função cardíaca em indivíduos é caracterizada por intervalos de tempo irregulares entre os batimentos cardíacos consecutivos. Os batimentos cardíacos não possuem a regularidade, portanto, alterações na FC, definidas como variabilidade da frequência cardíaca (VFC), são normais e esperadas e indicam a habilidade do coração em responder aos múltiplos estímulos fisiológicos e ambientais, dentre eles, respiração, exercício físico, estresse mental, alterações hemodinâmicas e metabólicas, sono e

ortostatismo, bem como em compensar desordens induzidas por doenças (AUBERT et al., 2003; ACHARYA et al., 2006).

Essa variabilidade é o resultado da oscilação rítmica dos componentes regulatórios da atividade cardíaca. Esses componentes são responsáveis pela manutenção da homeostase cardiovascular e por determinar respostas a desafios (VON BORELL et al., 2007). A VFC primariamente, resulta da atividade dos ramos individuais do Sistema Nervoso Autônomo, que recebe influências neuronais e humorais além de outros controles fisiológicos e mecanismos de feedback, como modificações do sistema respiratório, sistema vasomotor, sistema renina-angiotensina-aldosterona e sistema termorregulador (MALLIANI et al., 2001). O Sistema Nervoso Central (SNC), em particular os núcleos reticulares bulbares, o hipotálamo e as áreas neocorticais e paleocorticais, participam também na regulação da atividade cardiovascular. Sendo assim, o estímulo elétrico produzido no nodo sinoatrial recebe influência de diversos fatores que vão resultar na variabilidade de pulsos cardíacos (VON BORELL et al., 2007). Esta variabilidade é uma ocorrência de diferenças nos intervalos RR (o tempo entre complexos de ondas QRS no eletrocardiograma). O RR depende dos efeitos dos mecanismos que controlam o atividade do nodo sinoatrial (VON BORELL et al., 2007).

A Variabilidade pode ser investigada através de vários métodos lineares, incluindo um a análise no domínio do tempo e no domínio da frequência (análise espectral) (NOSZCZYK-NOWAK e BOGUCKI, 2013; WILK e JANCZAREK 2015).

Para a análise da VFC no domínio do tempo, assim denominada por expressar os resultados em unidade de tempo (milissegundos), mede-se cada intervalo RR durante um determinado intervalo de tempo e, a partir daí, com base em métodos estatísticos ou geométricos (média, desvio padrão e índices derivados do histograma ou do mapa de coordenadas cartesianas dos intervalos RR), calculam-se os índices tradutores de flutuações na duração dos ciclos cardíacos (HOSHI, 2009).

Os índices estatísticos obtidos no domínio do tempo são (HOSHI, 2009; VANDERLEI, 2009):

- a) SDRR - Representa o desvio padrão das médias dos intervalos RR normais, a cada 5 minutos, em um intervalo de tempo, expresso em ms;
- b) RMSSD - É a raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes, em um intervalo de tempo, expresso em ms;

Outro método linear é o domínio da frequência. Esta análise decompõe a VFC em componentes oscilatórios fundamentais, sendo que os principais são (HOSHI, 2009; VANDERLEI, 2009):

- a) Componente de baixa frequência (*Low Frequency* - LF), que é decorrente da ação conjunta dos componentes vagal e simpático sobre o coração, com predominância do simpático;
- b) Componente de alta frequência (*High Frequency* - HF), que corresponde à modulação respiratória e é um indicador da atuação do nervo vago sobre o coração;
- c) Componentes de muito baixa frequência (*Very Low Frequency* - VLF) e ultrabaixa frequência (*Ultra Low Frequency* - ULF) - Índices menos utilizados cuja explicação fisiológica não está bem estabelecida e parece estar relacionada ao sistema renina-angiotensina-aldosterona, à termorregulação e ao tônus vasomotor periférico. A relação

LF/HF reflete as alterações entre os componentes simpático e parassimpático do SNA, caracterizando o balanço simpato-vagal sobre o coração.

No presente estudo foram utilizados segmentos de 64 segundos para a análise da VFC. O uso de segmentos longos para a análise da VFC poderia dificultar a avaliação distinta da modulação cardiovascular simpática e parassimpática. Poucos estudos usaram a análise de VFC para medir o estresse mental. Salahuddin e colaboradores (2007) usaram série de tempos ultracurta para análise da VFC para avaliar estresse mental em indivíduos durante um teste Stroop. A análise dos dados foi realizada usando séries temporais com um comprimento variando de 10s a 150s e estes autores sugeriram que segmentos menores que 50 (ultra-curtos) podiam ser usados de forma confiável para monitorar as respostas autonômicas cardíacas (SALAHUDDIN et al., 2007). No entanto, no presente estudo, utilizaram-se segmentos curtos de 64s para análise de VFC para satisfazer os requisitos para a técnica de Fourier Transform Fast (FFT), isto é, os segmentos devem ser suficientemente longos para permitir a quantificação de componentes de baixa frequência. Em estudo realizado anteriormente mostrou que as mudanças induzidas por indução na modulação autonômica cardíaca não puderam ser observadas usando 128 segmentos, mas foram claramente observadas quando a análise da VFC foi realizada usando segmentos de 64 s (VILLAS-BOAS et al., 2016).

Outro aspecto metodológico importante dos estudos de VFC em cavalos é a faixa de bandas de frequência utilizada na análise espectral. No presente estudo utilizamos os limites de 0,01 a 0,07Hz para LF e de 0,07 a 0,5 Hz para HF (MATSUURA et al., 2010, VILLAS-BOAS et al., 2016). Essa faixa foi escolhida porque foi capaz de mostrar um aumento na relação LF / HF com dados menos variáveis do que as outras configurações. Para variações mais altas o limite de LF deve ser maior. Outros autores utilizam limites das bandas de frequência diferentes: LF: 0,04 – 0,15 e HF: 0,15 a 0,4 (VON BORELL et al., 2007; LF: 0,01 a 0,15 e HF: 0,15 a 0,5 (RIETMANN et al., 2004).

A partir dos valores obtidos de LF e HF, calcula-se a razão entre os dois componentes de frequência e assim, pode-se acessar o balanço entre a atividade simpática e parassimpática (VON BORELL et al., 2007). Desta forma, a VFC pode avaliar alterações do sistema nervoso autônomo (SNA) em diferentes níveis de excitação, sendo esta uma medida importante para quantificar o equilíbrio simpato-vagal, que permite uma avaliação mais precisa das respostas ao estresse mental durante o exercício de equinos (RIETMANN et al., 2004).

Dessa forma, o método espectral permite determinar com precisão se o equilíbrio do sistema autonômico resulta simplesmente da baixa atividade do sistema simpático (LF) ou de alta atividade do componente simpático (LF) acompanhado de alta atividade do sistema parassimpático (HF). A falta de equilíbrio no sistema autonômico indica que o componente simpático predomina sobre a parte parassimpática, isto prova que o estado emocional de um cavalo tem um grande impacto sobre os resultados da corrida (HADA et al., 2003). Um nível intermediário de excitabilidade emocional é assumido como o mais benéfico para cavalos de corrida (CALABRESE 2008). O sistema simpático é geralmente reforçado com uma atividade estável do parassimpático. Alta atividade do sistema simpático que não é contrabalançada pelo componente parassimpático, pode influenciar negativamente a corrida já que essas atividades refletem a resposta ao estresse no corpo (JANCZAREK, 2016). Dessa forma, podem

esperar-se melhores resultados de corrida em cavalos com atividade do sistema simpático acompanhada por uma atividade aumentada do sistema parassimpático do que em cavalos com alta atividade do sistema simpático, mas baixa atividade do sistema parassimpático (JANCZAREK, 2016).

O exercício físico induz a liberação de catecolaminas que, ao promoverem a contração esplênica com liberação de hemácias para a circulação sanguínea, gera um rápido e pronunciado aumento dessas células na circulação. O que eleva, conseqüentemente, o hematócrito (HT), que é a porcentagem ocupada pelos eritrócitos no volume total de sangue (PERSSON, 1983b) e proporciona melhor oxigenação tecidual, principalmente para o SNC e musculatura esquelética. Quem realiza o transporte de oxigênio para as células no sistema circulatório são os eritrócitos, através da afinidade que o oxigênio tem com a hemoglobina que é o principal constituinte de tais células. Desta forma, se ocorre o aumento da quantidade de eritrócitos, conseqüentemente aumenta o transporte de oxigênio para o músculo e SNC. Ao término do esforço físico, o hematócrito retorna ao seu valor de repouso, sem que a variação represente enfermidade (FERRAZ, 2007).

A resposta hematológica com extensa mobilização de eritrócitos do baço também é vista em situações de estresse psicológico. Essa resposta é considerada como efeito dos níveis plasmáticos aumentados de cortisol, decorrente de estresse crônico e do aumento de catecolaminas, decorrentes de estresse agudo.

O exercício provoca aumento transitório da concentração plasmática de catecolaminas, ACTH e cortisol estimulam do eixo hipotálamo-hipófise-suprarenal. As catecolaminas promovem mobilização de eritrócitos e linfócitos provenientes do baço, enquanto o ACTH e o cortisol estimulam a produção de neutrófilos e migração de granulócitos para os tecidos (ROSE et al., 1983). No entanto, o grau de variação não é tão dramático para o número de leucócitos quanto para o número de eritrócitos, hematócrito e concentração de hemoglobina. A elevação do hematócrito está relacionada com o aumento da intensidade do exercício e é decorrente também da perda de fluidos do plasma (PICCIONE et al., 2001).

Dessa forma, além da contração esplênica, o aumento do hematócrito pode se dar por perda de água do compartimento extracelular ou por troca transitória de fluidos entre o compartimento extra e intracelular. A perda de líquido é atribuída ao suor, principalmente quando as condições ambientais são de calor e umidade alta. Uma forma de se avaliar é através da análise das proteínas plasmáticas. O aumento da concentração de proteínas plasmáticas totais ocorre possivelmente em função da perda de fluidos do compartimento vascular pelo suor (ROSE et al., 1983; JABLOSNKA et al., 1991; ANDREWS et al., 1995). O grau de variação depende da duração e da intensidade do exercício. Um aumento de 5% nos níveis de proteínas plasmáticas totais durante o exercício reflete uma pequena variação no volume plasmático.

À medida que a intensidade do exercício aumenta, ocorre elevação da concentração de proteínas plasmáticas totais com o pico de elevação ocorrendo próximo ao pico de elevação do hematócrito (SNOW et al., 1983). As variações de proteínas plasmáticas totais são um indicador das variações de volume plasmático

O hematócrito pode aumentar em 40% durante o exercício devido à combinação tanto da contração esplênica quanto da redistribuição do volume de fluido circulante pelo aumento da pressão sanguínea arterial. O aumento do hematócrito é importante

porque a previne a queda da concentração de oxigênio sanguíneo durante o exercício intenso (SEEHERMAN et al., 1990).

A capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue é um dos fatores limitantes para o condicionamento atlético. Essa característica é maximizada pelo aumento total da massa eritrocitária, havendo uma relação bem definida entre o estado atlético e o volume total de eritrócitos em humanos e equinos, essa relação pode ser alterada pelo treinamento físico (HODGSON & ROSE, 1994a). No entanto, o aumento excessivo do hematócrito provocado pelo aumento da viscosidade sanguínea poderia causar redução da perfusão capilar e diminuição do aporte de O_2 às células, com prejuízo para o desempenho desportivo (PERSSON et al, 1967). Equinos com menores valores de hematócrito durante esforço máximo foram considerados animais de melhor desempenho. Dessa, forma hematócrito é considerado índice de desempenho válido por alguns autores, porém, a maioria dos autores baseia-se em índices de lactatemia e frequência cardíaca (MUÑOZ et al., 1997).

A glicose sanguínea geralmente aumenta em todos os tipos de exercício devido ao estímulo da glicogenólise hepática (ROSE et al, 1977), uma vez que a glicose é principal substrato energético que pode ser utilizado tanto pelo sistema nervoso central como pela fibra muscular esquelética durante o exercício. Contudo, mudanças na produção de glicose são geradas através da dependência de glicose plasmática nos tecidos, mediada pela glicogenólise e gliconeogênese hepática, influenciada pelo estado de condicionamento e intensidade, bem como pela duração do esforço (COGGAN, 1991), podendo ocorrer hiper ou hipoglicemia. Quando a concentração de glicose circulante diminui, o glicogênio hepático e muscular é degradado (glicogenólise) fazendo com que a glicemia volte a valores normais. Entretanto, em exercícios extenuantes ou prolongados o suprimento de glicose desses reservatórios não é sempre suficiente, o glicogênio é depletado, ocorrendo a síntese de glicose a partir de precursores não-carboidratos (gliconeogênese), a qual converte piruvato e compostos relacionados de três e quatro carbonos em glicose.

Andrews e colaboradores (1995) constataram que os acréscimos na concentração de glicose em equinos submetidos às provas de Concurso Completo de Equitação (CCE) eram superiores em comparação ao grupo de equinos submetidos a prova de enduro. Este aumento é decorrente do aumento da taxa de glicogenólise, provavelmente pelo aumento da demanda por glicose, além dos efeitos do estresse que estimula a liberação de glicose por estímulo adrenérgico. O aumento da glicogenólise e do estresse ocorre em consequência da duração prolongada da prova.

Durante o exercício, a demanda energética aumenta para ocorrer contração muscular. A energia suprida anaerobicamente pelo ATP e fosfocreatina durante a atividade física de alta intensidade se esgota rapidamente. O que torna o fator limitante para o desempenho da atividade física, a disponibilidade de glicose para a geração de energia pelo metabolismo anaeróbio e/ou aeróbio. A glicose sob a forma de glicogênio muscular é a fonte primária de energia durante o exercício extenuante em humanos e equinos. À medida que o exercício sub-máximo progride como ocorre em equinos treinados, a participação dos ácidos graxos como substrato para o fornecimento de energia via aeróbica aumenta (LACOMBE et al., 2003).

A insulina, o cortisol, a adrenalina e o glucagon são hormônios envolvidos diretamente na regulação e no equilíbrio da glicemia durante o exercício (FERRAZ,

2007). A glicemia de jejum em equinos, normalmente, varia de 60 a 90 mg/dL (RALSTON, 2002). Ferraz e colaboradores (2008) relataram diminuição da glicemia no início do teste incremental, seguida de aumento estimulado pela elevação da intensidade do estresse. Segundo Simões et al. (1999), a elevação da glicemia durante a etapa final do exercício está relacionada ao efeito das catecolaminas e do glucagon no fígado. Ainda, a adrenalina promove controle da glicogenólise durante o exercício, e no cavalo, este fato está diretamente relacionado a intensidade do estresse (NAKATA et al, 1999) em consequência da ação do cortisol (COELHO et al, 2011). Dessa forma, em um exercício de alta intensidade e curta duração espera-se um efeito hiperglicemiante, transitório seguido de normalização dos valores após o término do exercício (GORDON et al.;2007, FERRAZ et al.,2010; COELHO et al., 2011).

A mensuração do lactato sanguíneo pode ser usada para a predição do desempenho durante o exercício, sendo comumente utilizada em equinos. O acúmulo de lactato no sangue reflete um aumento do metabolismo anaeróbio e/ou uma diminuição nos mecanismos responsáveis pela remoção do lactato, ocasionando a perda do equilíbrio no organismo (CAPUTO et al., 2009).

O lactato é o produto do metabolismo muscular no exercício e o aumento de sua concentração é resultante da limitação da disponibilidade de oxigênio para oxidação do piruvato na mitocôndria. Em repouso, existe equilíbrio entre a produção muscular e a remoção hepática do lactato (LINDNER, 2000; GOMIDE et al., 2006). À medida que o exercício físico se intensifica, ocorre um desequilíbrio entre a produção e remoção, com conseqüente acúmulo de lactato no sangue e aumento de sua concentração, mostrando a estreita relação entre o aumento da velocidade do exercício e o aumento da concentração sanguínea de lactato (MESSER, 1995). Este aumento torna-se exponencial à medida que a contribuição da energia aeróbica passa a ser insuficiente frente às necessidades energéticas totais, ou seja, quando o limiar anaeróbico é atingido (LINDINGER, 2004) e ocorre a oxidação anaeróbica da glicose em ácido láctico (HYPPÄ & PÖSÖ, 1998).

Dessa forma, em baixas velocidades, há predomínio do metabolismo aeróbio e as concentrações de lactato se mantêm quase que inalteradas. Com o aumento da intensidade do exercício, a demanda energética passa a ser provida principalmente pelo metabolismo anaeróbio com aumento marcante dos valores de lactato, que é produzido para repor os valores de NAD⁺ necessário para manter a via glicolítica, caracterizado por uma inflexão repentina da curva de lactato para cima. O lactato basal num cavalo em repouso deve ser inferior a 1,5 mmol/L (TENNENT-BROWN, 2011). Embora diferentes autores defendem diferentes valores para o limiar de lactato, o que mais tem sido aceito e no qual se baseia a caracterização do tipo de esforço realizado pelo cavalo é lactato 2 mmol/L para o limiar superior de esforço; lactato entre 2 e 4 mmol/L para a zona de transição entre esforço aeróbio e anaeróbio e lactato = 4 mmol/L para o limiar inferior de esforço anaeróbico (CAMPBELL, 2011). Portanto, o ponto de mudança da oxidação aeróbia para anaeróbia é por volta de 4,0 mmol/L de lactato (WILMORE & COSTILL, 2001)

A ativação exagerada da via metabólica anaeróbia gera como consequência, alterações sistêmicas e locais causadas pelo aumento da concentração de lactato sanguíneo, prejudicando a continuidade do exercício físico, sendo então, um fator limitante na realização da atividade física (TEIXEIRA, 2010).

Segundo Ferraz et al (2008) o acúmulo de lactato nas fibras musculares durante exercício anaeróbico eventualmente pode exceder a capacidade tamponante das células, resultando em diminuição do pH intracelular o que vai afetar a contração muscular. De acordo com esses pesquisadores a avaliação do desempenho atlético através da mensuração de variáveis bioquímicas como o lactato é fundamental para o controle dos programas de treinamento de equinos que necessitam melhorar a capacidade aeróbica.

A atividade física faz variar a resposta ao cortisol, sendo dependente da modalidade esportiva (DESMECHT et al., 1996), da intensidade e da duração do exercício (SNOW e ROSE, 1981; MARQUES, 2002), do treinamento (FREESTONE et al., 1991; SIGHIERI et al., 1996; MARC et al., 2000; FERRAZ et al., 2010), do nível de aptidão, do estado nutricional e do local de colheita da amostra (SNOW, 1993;; COVALESKY et al., 1992).

Uma vez que certo limiar de esforço físico for ultrapassado, ocorrerá efeito sistêmico e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal será ativado (GRAAF-ROELFSEMA et al., 2007). A sensibilização do eixo EHHA libera cortisol, que controla largo espectro de funções metabólicas. Dentre elas, destaca-se o metabolismo energético por meio da gliconeogênese, sendo que este hormônio inibe a utilização de glicose pelos tecidos, priorizando a mobilização para o sistema nervoso central (SNC) e permitindo que, durante o exercício, a glicemia permaneça constante. Segundo Wilmore e Costill (2001), esse efeito previne o início da fadiga central. No entanto, quando aumentado excessivamente, exerce ações antiinflamatórias e supressoras da imunidade mediada por células, ou seja, age no sentido de inibir respostas necessárias para o combate a diversos tipos de lesões celulares e infecções.

Os níveis fisiológicos do hormônio permitem as respostas metabólicas, circulatórias e outras, necessárias para adaptação aos diversos tipos de estresse. Em contrapartida, níveis mais elevados de cortisol teriam a função de limitar as respostas adaptativas, impedindo que elas se tornem exageradas, deletérias para o organismo (AIRES, 1999). Dependendo da intensidade, tipo e duração do estímulo, exposições repetitivas a fatores estressantes podem resultar em adaptação ou em estresse crônico. A resposta de adaptação é crucial para o bem-estar do organismo, pois permite que o mesmo lide melhor com o estresse. A rapidez com que a adaptação ocorre depende da severidade, duração e tipo de estresse (VELLUCI, 1997).

A liberação de citocinas em resposta ao exercício físico foi descrito pela primeira vez em 1983 por Cannon e Kluger. As citocinas fazem parte de um complexo de vias de sinalização que interagem com o sistema endócrino como parte da resposta multifacetada a uma variedade de desafios fisiológicos, incluindo o exercício (MOYNA et al., 1996; PEDERSEN E HOFFMAN-GOETZ 2000).

Alguns estudos mostram efeitos do exercício sobre a função imune e sobre a liberação de citocinas em cavalos (DONOVAN et al., 2007; ADAMS et al., 2009; LIBURT et al., 2009). A atividade física pode induzir uma resposta inflamatória através de aumentos nos níveis séricos de IL-1, TNF- α e IL-6, seguidos pela liberação de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, que são inibidores das citocinas pró-inflamatórias. O perfil de resposta das citocinas pós-exercício pode variar de acordo com o tipo, duração e intensidade do exercício. Um exemplo disto é a liberação de IL-1, que parece ser mais sensível à intensidade do exercício, enquanto que a TNF- α e IL-6

são mais sensíveis à duração do exercício (PEDERSEN, 2005). A resposta inflamatória relacionada com a intensidade ou duração do exercício pode ser o suficiente para causar danos às células musculares (NORTHOFF et al. 1998; OSTROWSKI et al. 1998; MALM, 2002). Se for suficientemente grave, esse dano resulta em inflamação com liberação de enzimas celulares, uma cascata de citocinas pró-inflamatórias e uma resposta endócrina que muitos estudos de diferentes espécies caracterizaram como marcadores de dor de início tardio (do inglês DOMS) (NORTHOFF et al., 1998; OSTROWSKI et al., 1998; MALM, 2002; PEAKE et al., 2005).

As alterações celulares necessárias para afetar o desempenho variam de indivíduo para indivíduo (PEAKE et al., 2005). No entanto, nem toda inflamação é prejudicial e muitas citocinas modulam a resposta inflamatória e facilitam outros processos que são importantes para a reparação de tecidos (MALM, 2002; 2003; PEAKE et al., 2005; NIEMAN et al. 2007). Esta inflamação é uma resposta adaptativa a episódios repetidos de exercício. Esta inflamação inicia a síntese e sinalização de proteínas que leva à hipertrofia muscular.

Além de desempenharem um papel importante na modulação da resposta inflamatória, se considera que as citocinas pró-inflamatórias contribuem também para estresse crônico e depressão (MULLER et al., 2011; KIM et al., 2015). Por exemplo, a superexpressão de citocinas pró-inflamatórias, tais IL-1, IL-6 e TNF- α foram observadas no sangue de pacientes com depressão (HOWREN et al, 2009). Aumentos nos níveis de citocinas também foram encontrados no sangue e regiões específicas do cérebro em um modelo de depressão induzida pelo estresse crônico em ratos (BAY-RICHTER et al, 2011; YOU et al, 2011). A administração de citocinas pró-inflamatórias diretamente no cérebro induziu comportamento depressivo em roedores (PALIN et al, 2009), e a administração de antagonistas de citocinas reverteu comportamento depressivo (BRIETZKE et al, 2011).

Diante do exposto, como as respostas fisiológicas dependem das características do estímulo, o presente estudo teve o objetivo de descrever as respostas fisiológicas induzidas pelo exercício a campo de alta intensidade e baixa duração em cavalos de corrida. A partir destes dados poderemos, então, verificar se alguma manipulação ou estratégia pode alterar estas respostas e interferir de alguma forma na saúde e bem-estar animal.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 16 equinos, machos (10) e fêmeas (6), com idade entre 3 e 6 anos, da raça Puro Sangue Inglês, pesando entre 450 - 550 kg, provenientes do Jockey Club Brasileiro. Todos os animais estavam sendo utilizados como cavalos de corrida, com protocolo intenso de treinamento.

A rotina de treinamento está descrita a seguir:

- Treinos diários consistindo em aquecimento a trote por 1020m seguido de corrida de 3.060 m a uma velocidade média de 22,5 km/h (podendo variar de 20 a 25 km/h) na pista de areia.
- Um treino forte semanal, consistindo em aquecimento a trote por 600m seguida de corrida de 3.060 m a uma velocidade média de 52,5 km/h (podendo variar de 50 a 55 km/h) na pista de areia.
- No dia seguinte ao treino pesado, trabalho ao passo com o animal sendo conduzido no cabresto em pista de asfalto por 15 minutos.

O treinamento apenas apresenta variação para animais lesionados ou recém recuperados de lesão, sendo estes submentidos a exercício na piscina ou para animais que apresentam conformação menor ou considerados mais sensíveis sendo então treinamento em dias intercalos ao invés de treinamento diário.

No presente estudo não foram utilizados animais em recuperação recente de lesão. Apenas 2 animais apresentaram treino diferenciado (intercalado).

Os animais ficam confinados em baias com dimensões de 4mx4m, com passeios no cabresto duas vezes ao dia. Todos os animais possuem uma mesma rotina de manejo tornando o grupo bastante homogêneo. Todos os animais foram considerados saudáveis após exame clínico e liberação da veterinária responsável.

Todos os procedimentos foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biologia da UFRRJ (**CEUA/IB/UFRRJ**) (nº 16/2015) e estão de acordo com as normas internacionais de uso de animais em pesquisa.

Protocolo experimental

O experimento foi realizado em dois dias consecutivos, utilizando oito animais em cada dia, iniciando às 4:00h com as coletas basais. Em cada animal, em sua respectiva baia, foi realizada a colocação do frequencímetro cardíaco (Polar Equine™) ao redor do tórax e ativado. Após a ativação do frequencímetro foi realizada a coleta de sangue através da punção da veia jugular com agulha vacutainer em tubos com EDTA (4 ml) para análise do hematócrito, em tubos com fluoreto de sódio (4 ml) para análise de glicose e lactato e em tubos sem aditivo (10 ml) para análise de cortisol e citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6). Após a realização das coletas de sangue, os animais foram encilhados e em seguida levados para a pista de corrida de areia onde fizeram um aquecimento que consistiu num trote a uma velocidade média de 4 m/s por 1020m. Em seguida foram submetidos a um exercício submáximo que consistiu numa corrida de

3.060 m de distância e velocidade média de 12 m/s. A velocidade foi controlada tanto pelo jôquei utilizando um aparelho de GPS quanto pelo treinador utilizando um cronômetro. Foram realizadas coletas imediatamente após o exercício com os animais ainda na pista. Em seguida, foram levados para área de ducha, onde foram resfriados com água gelada e em seguida conduzidos para suas respectivas baias. Já em suas baias, foram realizadas as coletas de sangue 30 minutos, 2h, 4h, 6h e 12h após o exercício.

O protocolo experimental está esquematizado na figura 2.

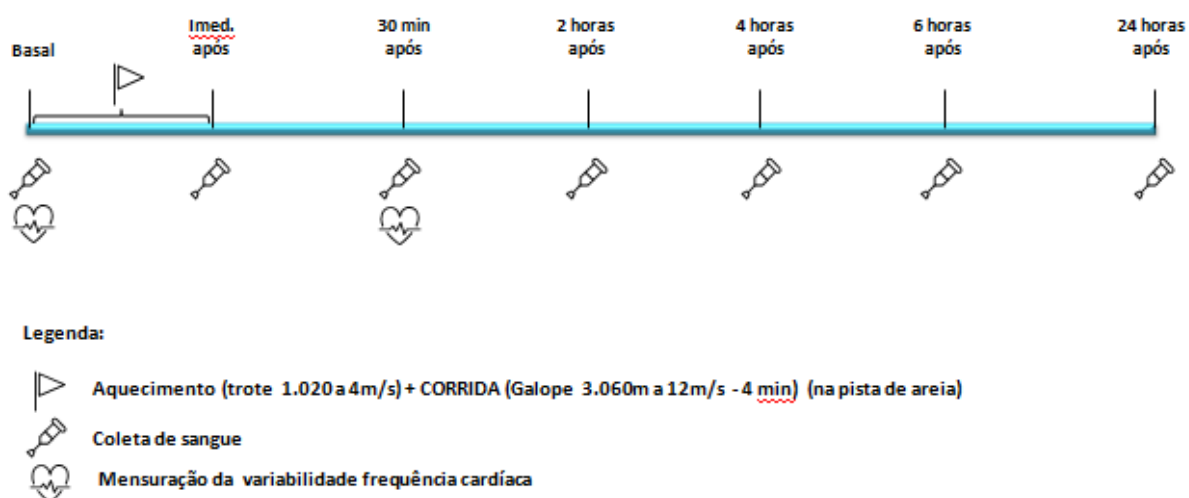


Figura 2: Esquema do protocolo experimental do exercício a campo de alta intensidade e curta duração.



Figura 3: Fases do protocolo experimental do exercício a campo. Em A, equino submetido ao exercício de alta intensidade e curta duração (12 m/s, 4min). Em B, coleta de sangue imediatamente após o exercício.

Coletas de sangue

As coletas de sangue foram realizadas através punção da veia jugular com agulha vacutainer em tubos com EDTA (4 ml) para análise do hematócrito, em tubos com citrato (4 ml) para glicose e lactato e em tubos sem aditivo (10 ml) para análise de cortisol e citocinas inflamatórias. As coletas foram realizadas nos momentos basais, imediatamente, 30 min, 2h, 4h, 6h e 24h após o exercício (Figura 4). As amostras foram acondicionadas sob refrigeração (em caixa térmica com gelo) e ao final do experimento foram centrifugadas utilizando a centrífuga modelo Centribio® na velocidade 20.379xG por 5 minutos e os soros foram estocados em freezer a -20°C.

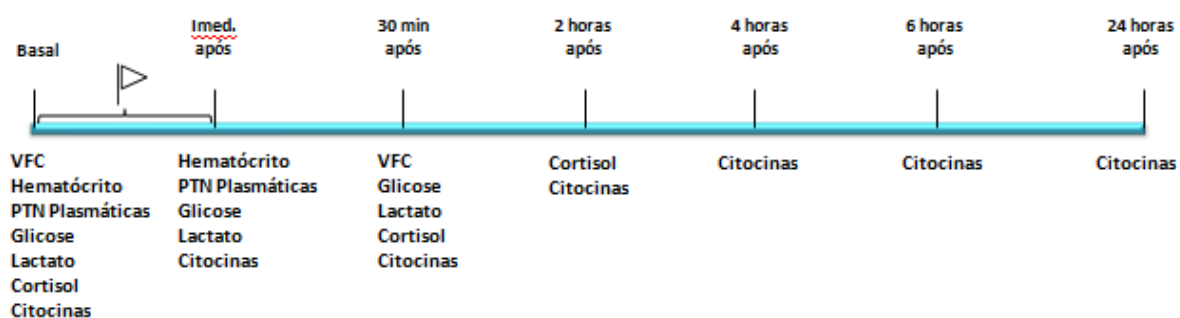


Figura 4: Esquema de tempos de coleta e parâmetros analisados.

Uso de Frequencímetros e Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca

Os intervalos RR dos animais foram registrados durante todo o tempo do experimento por um frequencímetro, RS 800 (Polar Equine®). Um eletrodo foi colocado na região precordial, no torax abaixo do codilho esquerdo, outro eletrodo próximo a cernelha na região torácica. Posteriormente, a região do eletrodo foi molhada abundantemente com uma solução preparada de água e shampoo neutro para garantir a condução dos impulsos elétricos. O transmissor do sistema capta os sinais e envia-os para o relógio do equipamento, que armazena estes dados.

Os dados armazenados no relógio foram enviados para o programa Polar Pro Trainer Equine por meio da interface de emissão de infravermelhos, para realizar a análise espectral da VFC.

Os dados obtidos foram dispostos num gráfico confeccionado a partir da FC (bpm) em razão do tempo (figura 5).

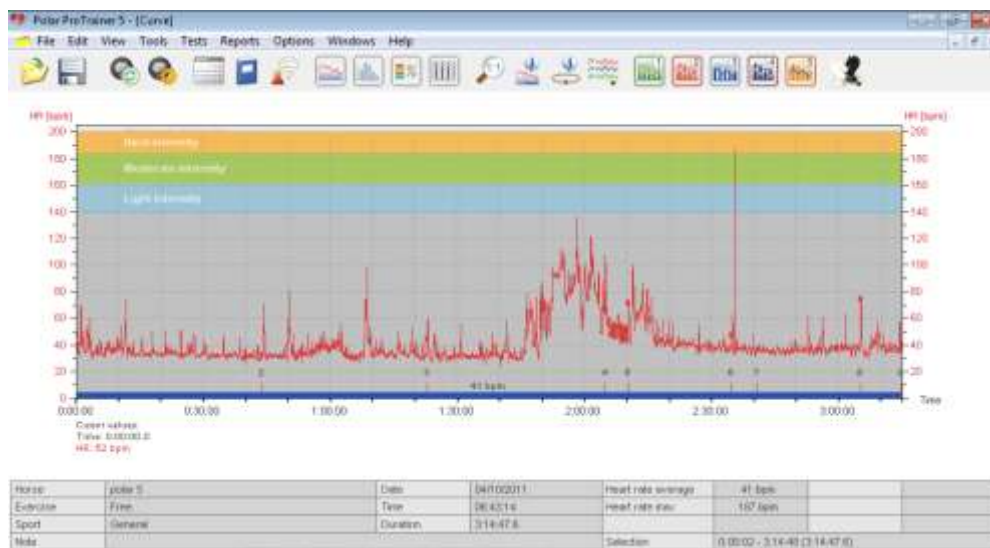


Figura 5: Gráfico confeccionado pelo programa Polar Pro Trainer 5®.

Os dados armazenados pelo programa Polar Protrainer 5 foram enviados para o programa Microsoft Office Excel 2007 sendo gerada uma lista de valores de intervalos RR em milissegundos (ms). Um gráfico foi construído a partir dos pontos de dados de intervalo cardíaco para realizar a inspeção. Em seguida, foram identificados visualmente e corrigidos os valores errados considerados artefatos de leitura. A correção desses artefatos de leitura ocorreu através da substituição dos valores de intervalos RR discrepantes pela média dos valores dos dois intervalos RR anteriores e dos dois posteriores (VON BORREL et al., 2007).

Foram selecionados apenas os momentos basais e 30 minutos após o exercício para serem analisados. A série de valores de intervalos RR no momento do exercício possuem muitos artefatos de leitura devido a movimentação do animal que provoca a perda de contato dos eletrodos com a pele produzindo muitos artefatos não sendo possível essa análise durante o exercício físico. Um estudo de Salo et al. (2001) avaliou o efeito de correção diferentes quantidades de batimentos na série de intervalo cardíaco, variando de 5 a 50% de correção. Nas correções de 5% foram observadas menores mudanças nos resultados, quando comparadas as séries originais não corrigidas. Além disso, Peltola (2012) indica que as séries temporais com 20% de correção devem ser rejeitadas.

Os segmentos com os valores do intervalo RR foram exportados em arquivo de texto (TXT) para o programa CardioSeries v2.4 que gera uma página com os valores dos parâmetros da análise da VFC no domínio da frequência e no domínio do tempo, de cada segmento. Foram analisados segmentos de 64s. Foi utilizada a Transformada Rápida de Fourier (FFT) para realizar a análise da VFC no domínio da frequência a partir da qual se obteve a razão entre os componentes frequenciais LF e HF. Essa razão permite identificar o balanço entre a ativação simpática e parassimpática nos momentos selecionados. Os valores das variáveis utilizadas pelo programa HRV analysis foram padronizados da seguinte forma: LF 0,01 – 0,07; HF – 0,07 – 0,5; taxa de interpolação = 4 e pontos no domínio da frequência = 256 (figura 6).

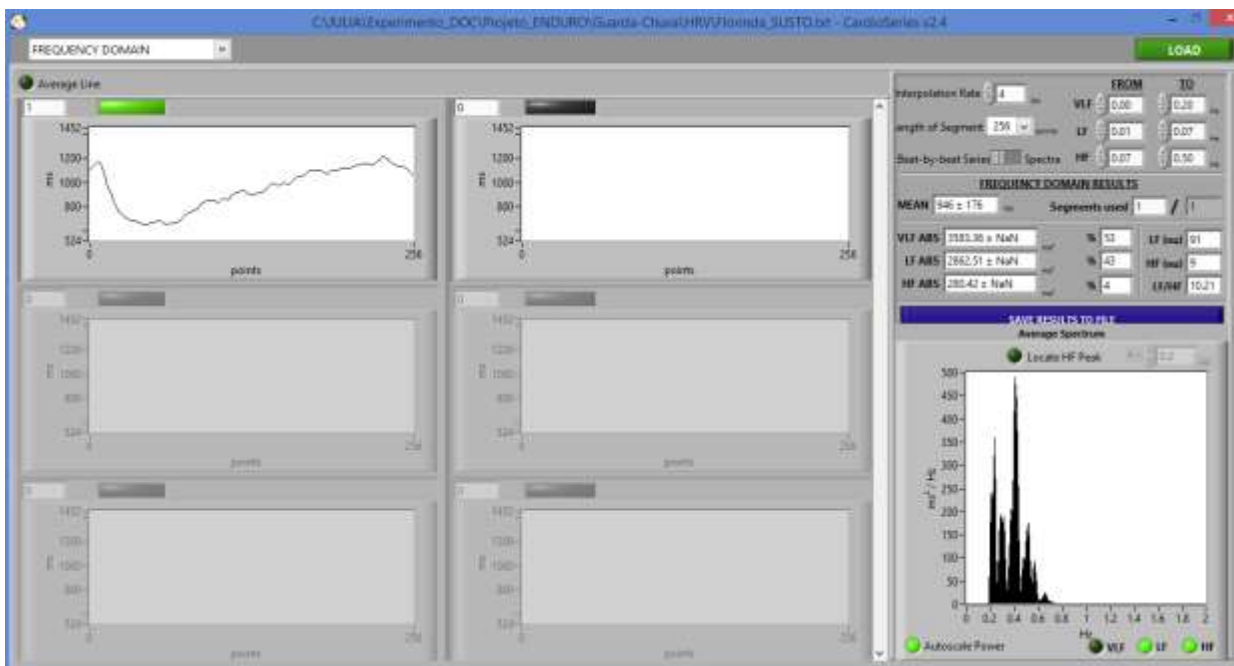


Figura 6: Análise da VFC pelo programa HRV analysis. Análise realizada através da Transformada Rápida de Fourier (FFT) para realizar a análise da VFC no domínio da frequência a partir da qual se obteve a razão entre os componentes frequenciais LF e HF. Os valores das variáveis utilizadas pelo programa HRV analysis: Segmentos de 64s; LF = 0,01 – 0,07; HF = 0,07 – 0,5; taxa de interpolação = 4 e pontos no domínio da frequência = 256.

Análise do Hematócrito

Amostras de sangue foram coletados nos momentos basal e imediatamente após o exercício (Figura 2). As amostras foram acondicionadas sob refrigeração (caixas térmicas com gelo) até o adequado processamento. As análises foram realizadas logo após a corrida do último animal, seguindo o protocolo descrito a seguir.

O tubo que contém o sangue com EDTA foi homogeneizado manualmente, e em seguida o tubo capilar foi preenchido pelo sangue por capilaridade (tubo capilar foi colocado no tubo com sangue com EDTA inclinando um pouco os dois, deixando que o sangue subisse no tubo por capilaridade até cerca de 1 cm da extremidade livre do capilar). Em seguida, a extremidade livre do tubo foi tampado com massa, e foi realizada a limpeza face exterior do tubo capilar. Os tubos foram colocados nos sulcos radiais da centrífuga modelo Micro Evlab®, tendo cuidado de por a extremidade vedada voltada para a periferia. Foi realizada a centrifugação por 5 min a uma velocidade de 20.379xG. O tubo foi retirado da centrífuga e em seguida realizada a leitura do hematócrito, utilizando a tabela de leitura.

Análise das Proteínas Plasmáticas

Amostras de sangue foram coletados nos momentos basal e imediatamente após o exercício (Figura 2). As amostras foram acondicionadas sob refrigeração (caixas

térmicas com gelo) até o adequado processamento. A análise das proteínas plasmáticas foi realizada por refratometria.

Análise do Lactato

As análises das concentrações séricas de lactato foram realizadas com o objetivo de verificar se o treino foi de intensidade suficiente para produzir um estímulo metabólico nos animais.

Amostras de sangue foram coletados nos momentos basal, imediatamente e 30 min após o exercício (figura 2). As amostras foram acondicionadas sob refrigeração e ao final do experimento foram centrifugadas utilizando a centrífuga modelo Centribio® na velocidade 3200 RPM ou 1400xG por 5 minutos. Após centrifugação e separação do plasma, as alíquotas de 1,0 ml foram acondicionadas em tubos tipo Eppendorf, devidamente identificados e armazenados em freezer à temperatura de -20°C para posterior análise.

A análise foi realizada por espectrofotometria utilizando kit reagente comercial para lactato (Katal® Lactato LOD-PAP) seguindo rigorosamente o protocolo do kit. Foi utilizado espectrofotômetro modelo BTS 315 (Biosystem®).

Análise da Glicose

Amostras de sangue foram coletados nos momentos basal, imediatamente após e 30 min após o exercício (figura 2). As amostras foram acondicionadas sob refrigeração e ao final do experimento foram centrifugadas utilizando a centrífuga Centribio® na velocidade 3200 RPM ou 1400xG por 5 minutos. Após centrifugação e separação do plasma, as alíquotas de 1,0 ml foram acondicionadas em tubos tipo Eppendorf, devidamente identificados e armazenados em freezer à temperatura de -20°C para posterior análise.

A análise foi realizada por espectrofotometria utilizando kit reagente comercial para glicose (Interkit® Glicose) seguindo rigorosamente o protocolo do kit. Foi utilizado espectrofotômetro modelo BTS 315 (Biosystem®).

Análise de Cortisol

As amostras foram coletas nos momentos basal, 30 min e 2h após o exercício (figura 2). As amostras foram acondicionadas sob refrigeração e ao final do experimento foram centrifugadas na velocidade 3200 RPM ou 1400xG por 5 minutos e os soros foram estocados em freezer a -20°C.

As análises foram realizadas no Laboratório de Neuroendocrinologia Comportamental do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ pela técnica de radioimunoensaio (RIE). Todos os ensaios/dosagens foram realizados em duplicata. Após descongelamento das amostras à temperatura ambiente e numeração dos tubos, foi pipetado em duplicata, 25µL de diferentes concentrações padrões de cortisol do kit (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 3; 10; 30; 100 µg/dl) nos tubos, adicionando-se 25µL dos soros testes e em seguida testados e posteriormente adicionado 1,0 ml de cortisol em todos

os tubos. Os tubos foram incubados em banho-maria por 45 minutos a 37°C +/- 1°C sendo feita em seguida decantação e secagem de todos utilizando um papel absorvente.

A contagem foi realizada em um contador gama calibrado para iodo radiativo (I125) da marca Wallac ®. Após as leituras, foi confeccionado o gráfico da curva padrão de acordo com as instruções do kit e os valores de cortisol das amostras testadas foram calculados a partir dos valores de radioatividade obtidos individualmente em relação aos valores da curva padrão. Os cálculos dos valores testes apresentados em µg/dl foram realizados através do programa Graph Prism 5.0. Para a manutenção da confiabilidade do teste, todos os valores deveriam estar dentro dos valores da curva padrão, não podendo ser considerados os valores fora da curva.

Análise de Citocinas

Amostras de sangue foram coletados nos momentos basal, imediatamente após, 2h, 4h, 6h e 24h após o exercício (figura 2). As amostras foram acondicionadas sob refrigeração e ao final do experimento foram centrifugadas na velocidade 3200 RPM ou 1400xG por 5 minutos. Após centrifugação e separação do plasma, as alíquotas de 1,0 ml foram acondicionadas em tubos tipo Eppendorf, devidamente identificados e armazenados em freezer à temperatura de -20°C para posterior análise. A análise foi realizada através técnica de ELISA utilizando o kit reagente comercial para IL-6 (Equine Interleukin 6 - Develop®) e IL-1β (Equine Interleukin 1 - Develop®), seguindo rigorosamente o protocolo dos kits. A leitura foi realizada utilizando a leitora de microplaca modelo Thermo Plate- TP Reader. Após a leitura, foi confeccionado o gráfico da curva padrão de acordo com as instruções do kit. Para a manutenção da confiabilidade do teste, todos os valores deveriam estar dentro dos valores da curva padrão, não podendo ser considerados os valores fora da curva. Os valores da curva padrão da IL-1β e IL-6 são, respectivamente, 13,315; 25,015; 59,85; 107,53; 373,57; 902,065; 1994,5 e 0,001; 0,086; 0,342; 0,611; 1149,5; 2287,5; 2497; B: 0,003.

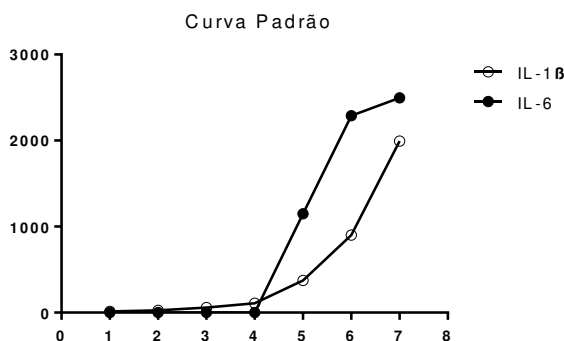


Figura 7: Curva Padrão das citocinas IL-6 e IL-1β: Obtida através da preparação de diluições em série (de S1 a S7) de 1:2. de acordo com as instruções dos kits Equine Interleukin 6 - Develop® e Equine Interleukin 1 - Develop®. Seguindo as diluições Padrão, como 500pg / mL (S1), 250pg / mL (S2), 125pg / mL (S3), 62.5pg / mL (S4), 31.25pg / mL (S5), 15.62pg / mL (S6), 7.81pg / mL (S7), e Branco como 0pg / mL.

Análises Estatísticas

Os resultados das variáveis hematócrito, proteínas plasmáticas e VFC foram comparados pelo teste t pareado. Os parâmetros glicose, lactato, cortisol e citocinas foram submetidas à ANOVA de uma via para medidas repetidas, quando significativas foram comparadas pelo Teste de Bonferroni. Para avaliação do efeito do sexo todos os parâmetros foram avaliados pela ANOVA de uma duas para medidas repetidas seguida pelo Teste de Bonferroni. Para avaliação da existência de correlação entre os parâmetros foi utilizado o teste de Pearson. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão. As análises estatísticas foram realizadas com SPSS Versão 21 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) utilizando intervalo de confiança de 95% e probabilidade de 5%. Os gráficos foram construídos usando GraphPad Prism 5.0 (Software GraphPad).

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Variabilidade da Frequência Cardíaca

O teste t pareado detectou diferença significativa entre os momentos Basal e Pós 30min na razão LF/HF ($p = 00,002$, figura 8B); no componente de baixa frequência (LF, $p = 00,006$, figura 8C), nos componentes de alta frequência (HF, $p = 0,018$, figura 8D) e na frequência cardíaca (FC, $p < 0,001$, figura 8A). Neste sentido houve aumento da FC, do LF e da razão LF/HF e concomitante diminuição do HF; o que indica um aumento do componente simpático em relação ao componente parassimpático mesmo 30min após o término do exercício.

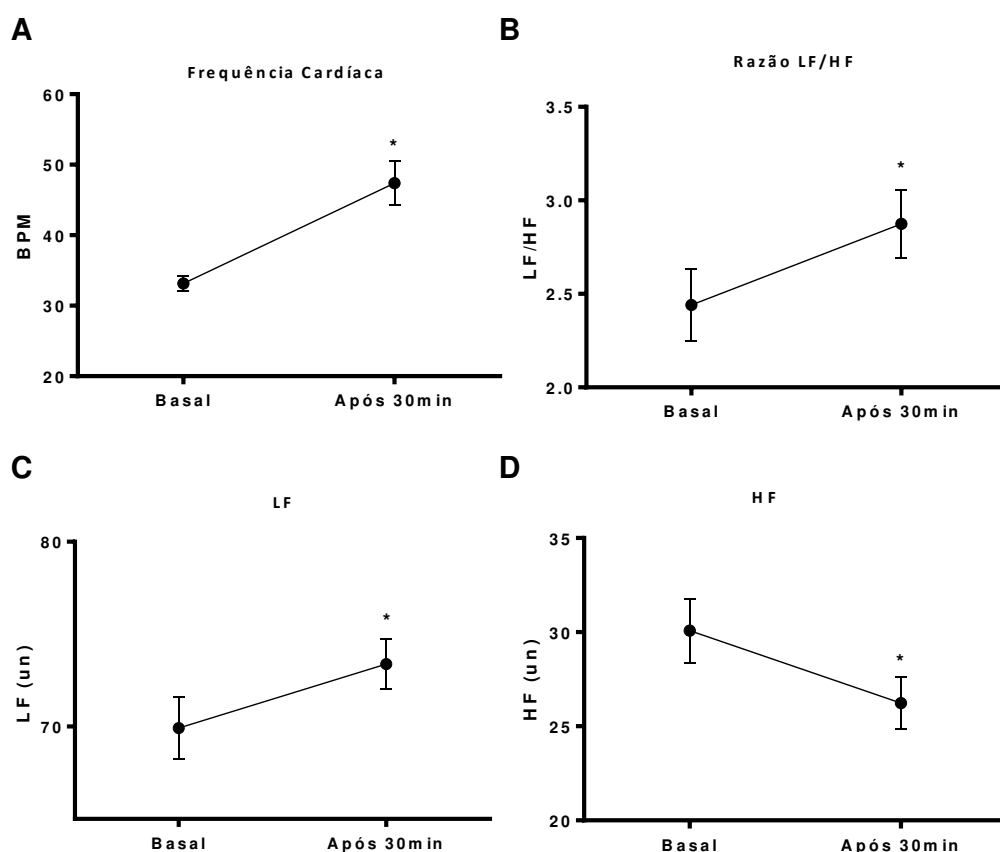


Figura 8: Efeito do exercício físico a campo de alta intensidade e baixa duração na VFC de equinos. Os dados são apresentados como média \pm epm nos momentos Basal ($n=13$) e após 30 min ($n=13$). Em A, efeito do exercício na Frequência Cardíaca Média. Em B, efeito do exercício na VFC, expressa pela razão LF/HF. Em C, efeito do exercício na VFC, expressa pelo componente de baixa frequência LF. Em D, efeito do exercício na VFC, expressa pelo componente de alta frequência HF. (*) indicam diferença significativa entre os momentos analisados através do teste t pareado ($p \leq 0,05$).

1.3.2 Hematócrito

Na análise estatística do hematócrito, o teste t pareado detectou diferença significativa entre os momentos Basal e Pós 30min ($p < 0,001$). Os animais demonstraram um aumento significativo do valor do hematócrito imediatamente após o exercício em relação ao momento basal (figura 9A).

1.3.3 Proteínas Plasmáticas

Na análise estatística das proteínas plasmáticas, o teste t pareado detectou diferença significativa entre os momentos Basal e imediatamente após o exercício ($p < 0.001$). Os animais demonstraram um aumento significativo do valor das proteínas plasmáticas imediatamente após o exercício em relação ao momento basal (figura 9B).

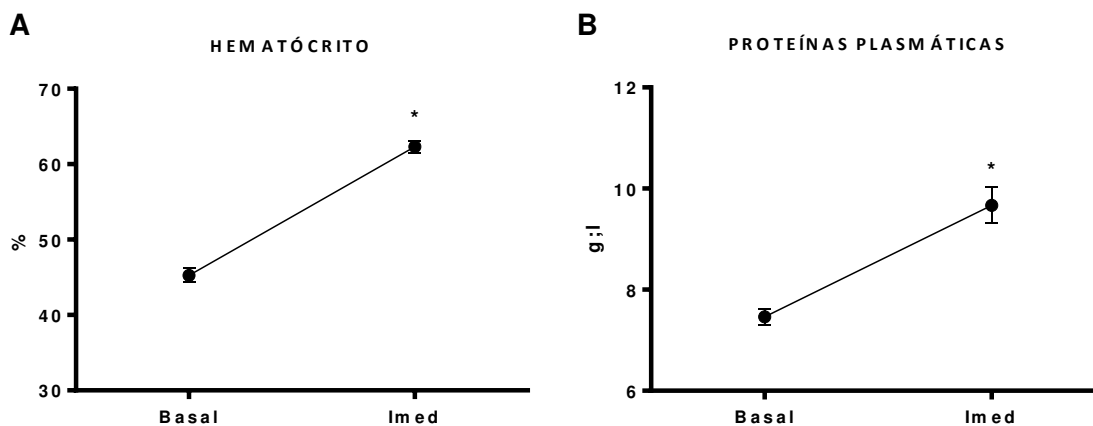


Figura 9: Efeito do exercício físico a campo de alta intensidade e baixa duração no hematócrito e proteínas plasmáticas totais de equinos. Os dados são apresentados como média \pm epm nos momentos Basal ($n=16$) e imediatamente após o exercício (Imed) ($n=16$). * indica diferença significativa entre os momentos analisados através do teste t pareado ($p < 0,001$).

1.3.4. Lactato

Na análise estatística do lactato, a ANOVA de uma via pra medidas repetidas detectou diferença significativa entre os momentos Basal, Imed e Pós 30min (Wilks' Lambda = 0,090; $F_{(2,14)} = 71,011$; $p < 0.0001$). Os animais demonstraram um aumento significativo do valor do lactato imediatamente após o exercício em relação ao momento basal ($p < 0.0001$). Aos 30 minutos do término do exercício foi observada redução significativa do valor médio de lactato em relação ao observado imediatamente após o teste ($p < 0.0001$), no entanto, não retornou aos valores basais ($p < 0,0001$; figura 10A).

1.3.4 Glicose

Na análise estatística da glicemia, a ANOVA de uma via pra medidas repetidas detectou diferença significativa entre os momentos Basal, Imed e Pós 30min (Wilks' Lambda = 0,186; $F_{(2,12)} = 26,176$; $p < 0.0001$). Os animais demonstraram um aumento significativo do valor da glicose imediatamente após o exercício em relação ao momento basal ($p < 0.0001$). Aos 30 minutos do término do exercício não foi observada redução significativa do valor médio da glicose em relação ao observado imediatamente após o teste ($p = 0,545$), não retornando aos valores basais ($p < 0,0001$) (figura 10B).

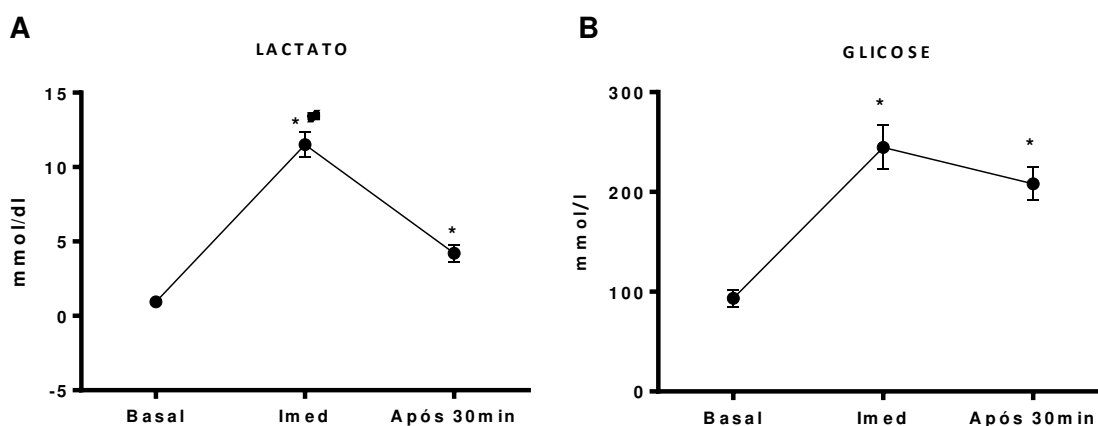


Figura 10: Efeito do exercício físico a campo de alta intensidade e baixa duração no lactato (em A) e na glicose (em B) de equinos. Os dados são apresentados como média \pm epm nos momentos Basal ($n=16$), imediatamente após (Imed) ($n=16$) e 30 min após o exercício (Pós 30min) ($n=16$). * indica diferença significativa em relação ao Basal ($p < 0,05$) e \neq indica diferença em relação ao pós 30min ($p < 0,05$). Análise através da ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

1.3.5 Cortisol

Na análise estatística do cortisol, a ANOVA de uma via pra medidas repetidas detectou diferença significativa entre os momentos Basal, Imed e Pós 30min (Wilks' Lambda = 0,384; $F_{(2,12)} = 9,632$; $p = 0,03$). Os animais demonstraram um aumento significativo do valor do cortisol 30 minutos após o exercício em relação ao momento basal ($p = 0,029$). Após 2 horas do término do exercício foi observada redução significativa do valor do cortisol em relação ao observado imediatamente após o teste ($p = 0,002$) (figura 11).

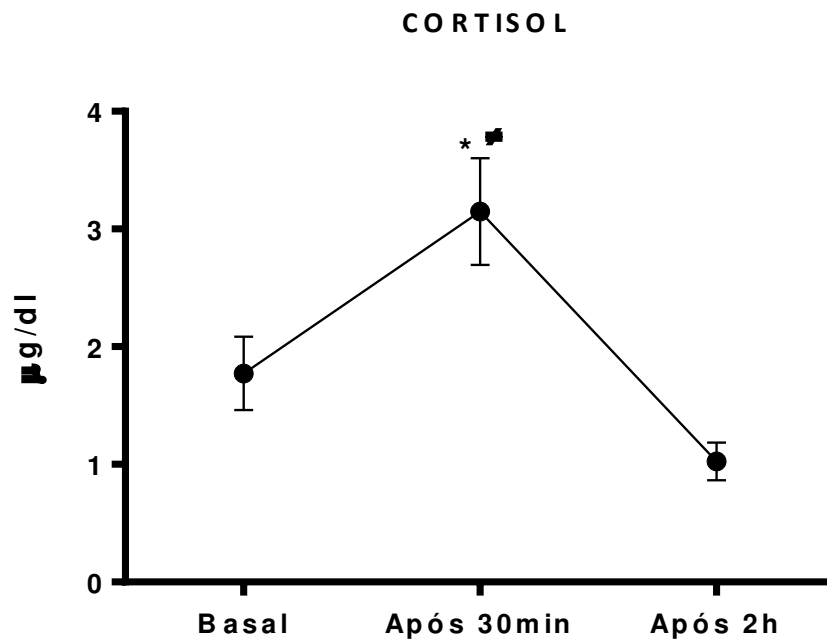


Figura 11: Efeito do exercício físico a campo de alta intensidade e baixa duração no cortisol de equinos. Os dados são apresentados como média \pm epm nos momentos Basal ($n=14$), imediatamente após (Imed) ($n=14$) e 30 min após o exercício (Pós 30min) ($n=14$). * indica diferença significativa em relação ao Basal ($p < 0,05$) e \neq indica diferença em relação ao pós 30min ($p < 0,05$). Análise através da ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

1.3.6 Citocinas

Na análise estatística do citocinas plasmáticas IL-1 β e IL-6, o teste ANOVA de uma via para medidas repetidas não detectou diferença significativa entre os momentos após exercício e o momento basal (Figura 12A). A análise da IL-6 apresentou valores não detectáveis na maioria dos animais em todos os tempos (Figura 12B).

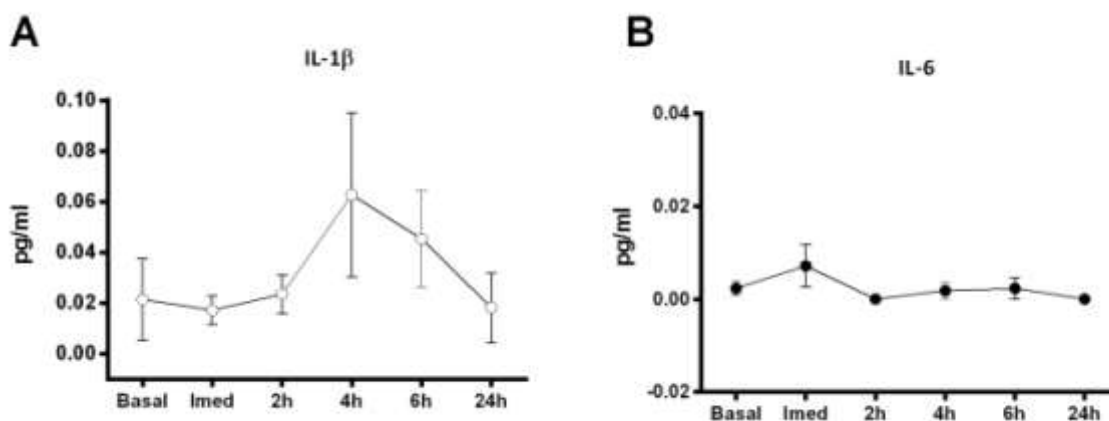


Figura 12 Efeito do exercício físico a campo de alta intensidade e baixa duração nas citocinas inflamatórias de equinos. Os dados são apresentados como média \pm epm nos momentos Basal, imediatamente após (Imed) e 30 min, 2h, 4h, 6h, 24h após o exercício. **Em A:** Análise de IL-1 β . Não foi detectada diferença significativa entre nenhum momento. Análise realizada pela ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Bonferroni. **Em B:** Análise de IL-6. O gráfico demonstra que as citocinas não foram detectáveis.

1.3.7 Efeito do sexo na reatividade ao estresse físico

Para avaliação do efeito do sexo do animal na reatividade ao exercício físico proposto, todos os parâmetros foram analisados pela ANOVA de uma duas para medidas repetidas seguida pelo Teste de Bonferroni. Os resultados mostram que em nenhum parâmetro houve diferença significativa entre machos e fêmeas nas respostas fisiológicas ao exercício de alta intensidade e curta duração (figura 13).

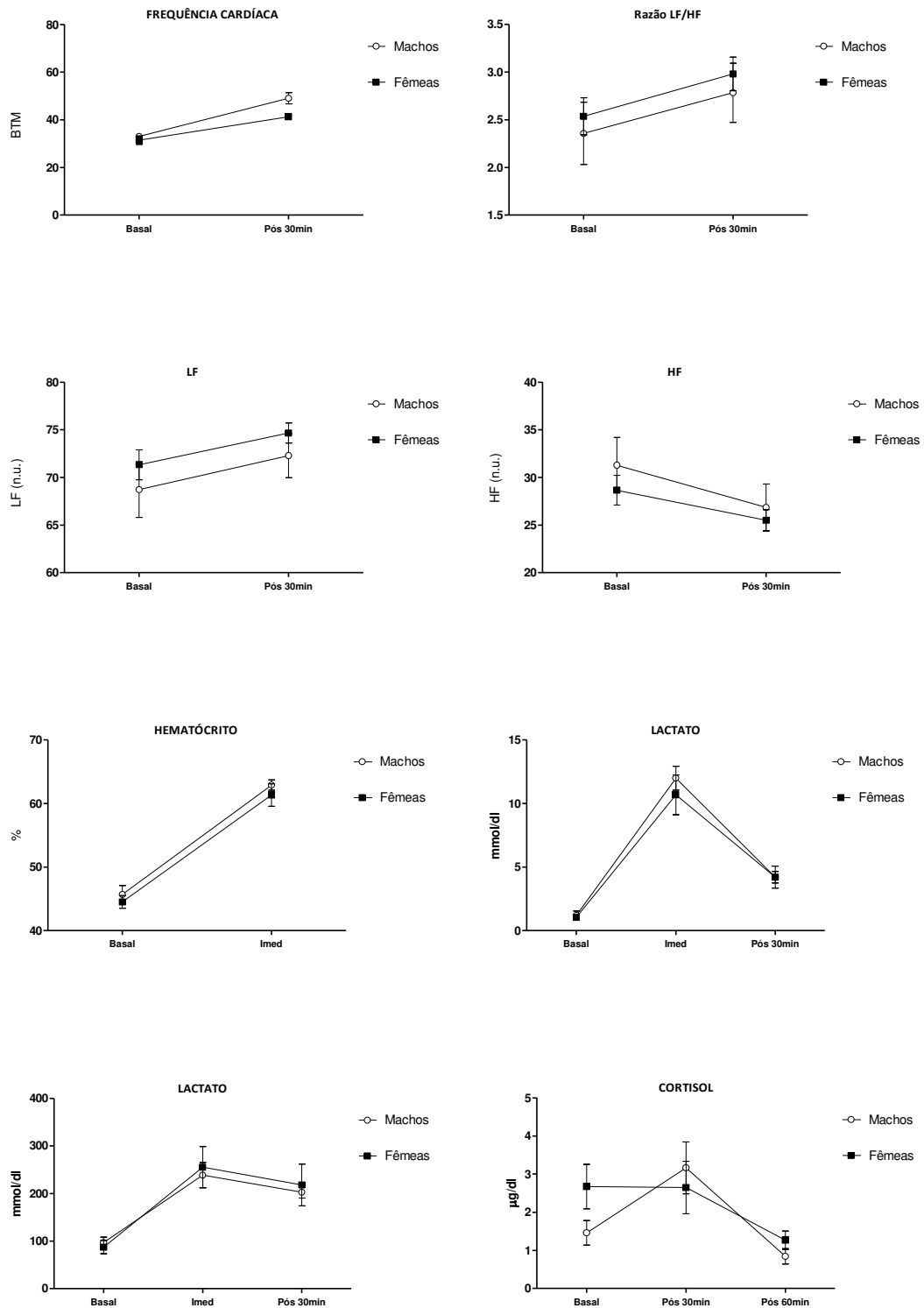


Figura 13: Efeito do sexo na reatividade de equinos ao exercício a campo de alta intensidade e curta duração através da análise da VFC (frequência cardíaca, razão LF/HF, LF e HF), hematócrito, lactato, glicose e cortisol. Os dados são apresentados como média \pm epm. Não houve diferença significativa entre machos e fêmeas em nenhum dos parâmetros analisados.

1.3.8 Efeito da idade na reatividade ao estresse físico

Para avaliação do efeito da idade na reatividade ao exercício físico proposto, foi realizada a correlação de dados (idades (3, 4, 5 e 6 anos) versus delta (obtido através da diferença entre os valores pós-exercício e os valores basais). Os resultados mostram que não houve correlação entre as idades e as respostas fisiológicas ao exercício de alta intensidade e curta duração proposto no presente estudos (figura 14).

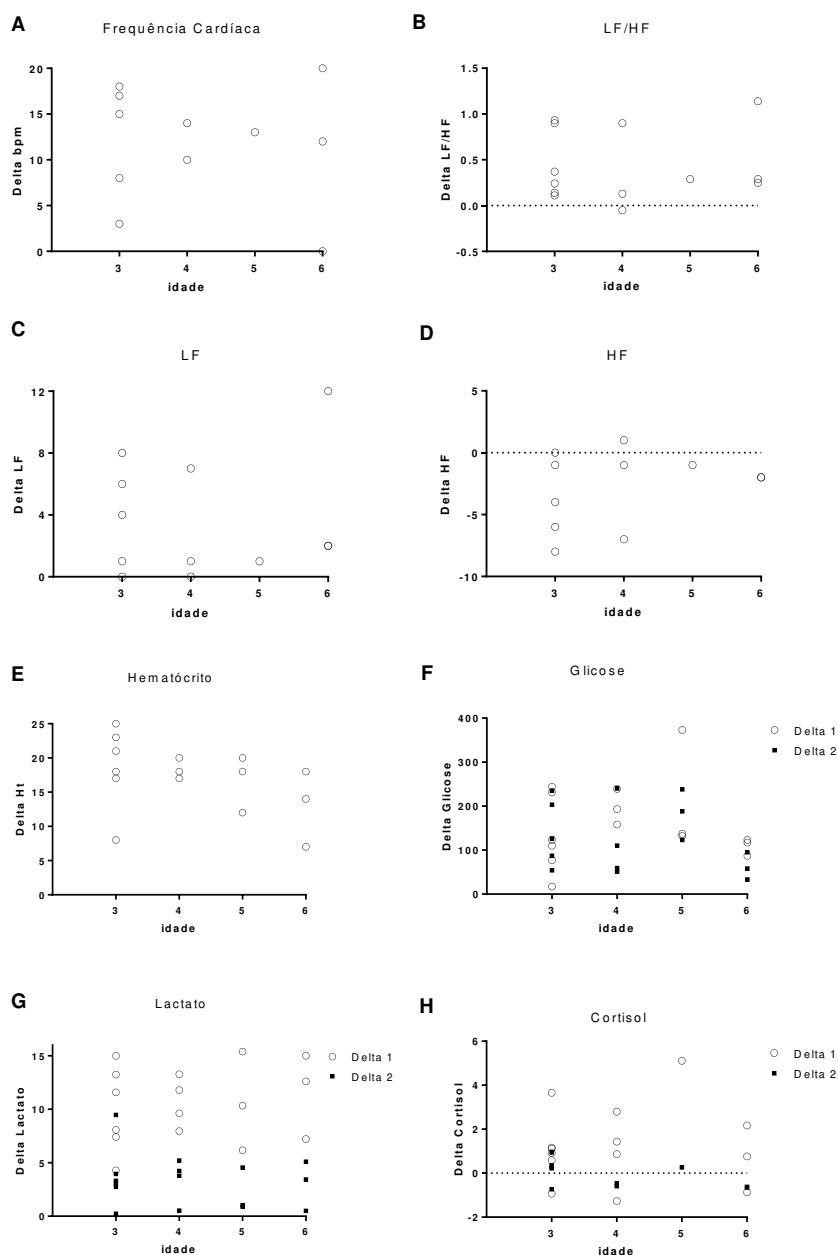


Figura 14: Efeito da idade na reatividade de equinos ao exercício a campo de alta intensidade e curta duração: Em A, B, C e D: Correlação entre as idades e VFC (diferença entre os valores pós-exercício e os valores basais) (frequência cardíaca, razão LF/HF, LF e HF); Em E: Correlação entre as idades e o hematócrito (diferença entre os valores pós-exercício e os valores basais); Em F e G: Correlação entre as idades e lactato e glicose (diferença entre os valores imediatamente após o exercício e os valores basais (delta 1) e (diferença entre os valores 30 min após o exercício e os valores basais (delta 2); Em H: Correlação entre as idades e o cortisol (diferença entre os valores 30 min após o exercício e os valores basais (delta 1) e (diferença entre os valores 2h após o exercício e os valores basais (delta 2). Não houve correlação entre as idades e as respostas fisiológicas ao exercício de alta intensidade e curta duração proposto no presente estudo.

1.4 DISCUSSÃO

O exercício de corrida de alta intensidade baixa duração em equinos Puro sangue inglês induziu respostas autonômicas (com aumento do tônus simpático em relação ao parassimpático), bioquímicas (aumento do lactato e da glicose plasmática), endócrinas (aumento dos níveis séricos de cortisol) e hematólogicas (aumento no hematócrito), sem alterar significativamente os níveis de citocinas inflamatórias.

O objetivo do exercício proposto no presente estudo foi promover alterações fisiológicas significativas, mas sem produzir alterações deletérias ao indivíduo. Neste sentido, como os animais do estudo são atletas submetidos a uma rotina de treinamento e competições, acreditamos que o exercício proposto é discretamente menos intenso do que o treino considerado forte para esses animais. Desta forma podemos avaliar e descrever as alterações fisiológicas que ocorrem no organismo em resposta a um modelo padronizado de estresse físico para que este possa ser utilizado em pesquisas futuras que avaliam fatores de risco, de resiliência e estratégias que alteram a reatividade ao estresse. Assim podemos avaliar também estratégias que melhoram a reatividade ao estresse, seja ela por meio de treinamento ou através de outras estratégias, como por exemplo, o controle de estresse psicológico.

O exercício representa uma condição de estresse mais fisiológico que existe, uma vez que altera muitos sistemas, dentre eles o sistema nervoso autonômico e endócrino. Este apenas se torna patológico quando essas alterações são exarcebadas ou prolongadas e o organismo não é capaz de restabelecer o equilíbrio, gerando doenças.

A prática regular de exercício físico está associada à promoção da saúde e à prevenção de doenças. O exercício regular, ou treinamento físico, de intensidade moderada melhora os sistemas de defesa do organismo. Além disso após uma sessão de exercício físico, inicia-se normalmente a fase de recuperação, quando são observados diversos efeitos positivos, incluindo o aumento da resistência a novas lesões induzidas ou não por exercícios, fato que é considerado como um processo "adaptativo". Porém, quando exercício é intenso e prolongado, ou, ainda, indivíduos que possuem elevada frequência de treinamento, essa recuperação não é alcançada. Somado a isso, o exercício extenuante pode causar imunossupressão. Estas alterações comprometem a defesa do organismo contra agentes infecciosos e oncogênicos, assim como nos processos alérgicos (NOBREGA, 2005).

A análise da VFC durante o estresse em equinos é extremamente relevante, pois permite acessar o balanço autonômico independentemente de outros fatores que alteram a FC. No repouso, a regulação parassimpática predomina e quando ocorre aumento na atividade física, há um incremento da ativação simpática. Ainda assim, os dois ramos do SNA possuem a habilidade de atuar de forma simultânea ou independente um do outro, na regulação da atividade cardíaca. Sendo assim, o aumento da atividade vagal não resulta instantaneamente na redução da simpática e vice-versa. Desse modo, não é possível determinar as características regulatórias do SNA, simplesmente, através da mensuração da FC (VON BORELL et al., 2007). Ainda assim, a FC pode ser considerada como um índice indireto de estresse, sendo importante a sua análise, em conjunto com outros parâmetros.

Os resultados mostram que o exercício físico provoca alterações significativas na atividade do sistema nervoso autônomo nos cavalos examinados no período de 30 minutos após o exercício, através do aumento da banda de baixa frequência LF (refletindo a atividade do sistema simpático) e da razão LF/HF (indicando aumento atividade simpática em relação a parassimpática) e diminuição significativa da banda de alta frequência HF.

É importante salientar que a VFC foi mensurada no período de repouso nos momentos basais e 30 minutos após o exercício devido ao fato de que uma das limitações dessa ferramenta é que a movimentação do animal provoca a perda de contato dos eletrodos com a pele produzindo muitos artefatos não sendo possível essa análise durante o exercício físico. Os artefatos interferem na análise da VFC, comprometendo a confiabilidade dos índices obtidos, se eles não forem removidos (VANDERLEI et al., 2009). Sendo que séries temporais com correção maiores que 20% devem ser rejeitadas (PELTOLA, 2012).

O período de 30 minutos após o exercício foi escolhido para análise baseado nos resultados de Van Breda e colaboradores (2006). Neste estudo, com objetivo de avaliar o nível de estresse causado pelo adestramento em equinos foram observados aumentos significativos nos parâmetros de VFC 30 a 45 minutos pós-exercício (basal: LF = $87,86 \pm 9,48$; HF = $12,14 \pm 10,56$; LF/HF = $1,8 \pm 0,7$ e 30 a 45 minutos pós-exercício: LF = $98,83 \pm 12,1$; HF = $23,09 \pm 9,1$; LF/HF = $11,07 \pm 6,4$). Em outro estudo, realizado por Matsuura e colaboradores (2010) no qual foi comparado o nível de estresse de equinos que cavalgavam em posição de líder (posicionado a frente) com os equinos seguidores (posicionado atrás do cavalo líder), a VFC foi analisada aos 30, 60 e 90 minutos após o exercício (MATSUURA, 2010).

Cavalos que participam de corridas, as respostas ao estresse aumentam progressivamente até um ponto em que o corpo se torna incapaz de gerenciá-los. Conforme relatado por Kato et al. (2003), a atividade do sistema parassimpático aumentada reflete um estado de relaxamento físico e mental. Ele exerce um efeito trofotrópico, que é uma combinação de atividade parassimpático e relaxamento dos músculos, sobre os processos de regeneração, inibindo a utilização de energia (BASELLI et al. Al. 1987). No entanto, Janczarek e colaboradores (2013) observaram o oposto, enfatizando o impacto negativo do treinamento de corrida sobre o status emocional dos cavalos como descrito por Landers (2006). Comparando os parâmetros em repouso com os parâmetros após o exercício físico, foi observado um aumento na atividade simpática e uma diminuição da atividade parassimpático. Obviamente, esse padrão dos componentes do sistema autonômico contribui para um desequilíbrio do sistema. Está provado que um aumento na atividade do sistema simpático é causado tanto pelo exercício físico quanto por outras situações, como necessidade de maior atenção ou estado de alerta. Situações estas que ocorrem quando os cavalos são introduzidos em novas instalações (Wilk et al., 2015) ou apresentados a objetos novos (VISSER et al., 2001; NICOL et al., 2005; VISSER et al, 2008; CHRISTENSEN et al., 2010, VILLAS-BOAS, 2015; VILLAS-BOAS, 2016. KINNUNEN et al., 2006). Janczarek e colaboradores (2013) relataram aumento resposta de estresse em cavalos após a temporada de corrida ter começado do que no período de preparação. Além disso, observou-se aumento da atividade do sistema nervoso autônomo durante a alta intensidade de treinamento que precederam a participação numa corrida.

A atividade do sistema nervoso autônomo em repouso e pós-exercício em cavalos de raça pura são variados e podem mudar durante a temporada de corrida. Após o exercício físico a atividade do sistema simpático é geralmente reforçada com um sistema de atividade parassimpático estável. Esta é uma resposta adaptativa fisiológica. No entanto, segundo, Janczarek e colaboradores (2013) pode-se esperar melhores resultados em cavalos de corrida com atividade simpática aumentada acompanhada por um aumento da atividade parassimpático do que em cavalos com elevada atividade do sistema simpático mas com baixa atividade parassimpática.

O aumento de hematócrito verificado após o exercício proposto no presente estudo é resultante de mobilização de eritrócitos oriundos do baço e redistribuição do volume plasmático circulante. O aumento da concentração de proteínas plasmáticas totais ocorre possivelmente em função da perda de fluidos do compartimento vascular pelo suor (ROSE et al., 1983; JABLONKA et al., 1991; MC KEEVER et al., 1993; ANDREWS et al.; 1995).

O referido aumento do hematócrito após o exercício é resultante do estímulo simpático que mobiliza eritrócitos armazenados no baço, com a finalidade de aumentar a capacidade sanguínea de transporte de oxigênio (KINGSTON, 2004). Os resultados do presente estudo corroboram com Andrews et al. (1995) que mostraram em estudos anteriores aumentos nas porcentagens de hematócrito chegando a valores de 65 a 70% em cavalos de corrida. Em exercício físico de baixa intensidade, com frequência cardíaca abaixo de 150 bpm, observam-se menores variações nos valores de hematócrito o que foi atribuído a uma contração esplênica de menor intensidade, provavelmente associada a um estímulo simpático também menor (LEKEUX et al., 1991). Exercícios de curta duração levam a perda de cerca de 5 a 10% do volume plasmático pela sudorese e ao se prolongar a atividade ocorrerá significativa redução deste volume, provocando aumento do hematócrito (KINGSTON, 2004). McKeever et al. (1993) descreveu o aumento de hematócrito em cavalos submetidos a diversas intensidades de exercício. Schalm (1979) avaliou os principais parâmetros hematológicos de equinos Puro Sangue com idades superiores a 5 anos de idade. Os valores médios obtidos foram: hematócrito (%) = 40,8 e proteínas plasmáticas totais = 7,0 g/dl.

O exercício físico é acompanhado por variações na regulação hormonal da glicemia (JABLONKA et al., 1991) que ocorre de acordo com o consumo desta pelos músculos e a taxa de glicogenólise e gliconeogênese. A velocidade e duração do exercício são os fatores mais importantes para alteração na concentração de glicose (ROSE & HODGSON, 1994). Além disso, os valores médios dos teores séricos de glicose podem sofrer elevação nos diferentes tipos de exercício, sendo proporcional à intensidade do esforço físico.

O exercício proposto no presente estudo provocou um aumento significativo da glicemia. Elevações na glicemia durante e após o exercício intenso são frequentemente observadas, sendo um achado consistente na literatura. O efeito hiperglicemiante, transitório visto a normalização dos valores após o término do exercício é descrito por diversos autores (SIMÕES et al., 2003; GORDON et al.; 2007; FERRAZ et al. 2010). As concentrações de glicose aumentaram significativamente após exercício intenso em esteira rolante (FERRAZ et al., 2008) e em prova de corrida em curta distância (BRAZ et al., 2016). Enquanto que Fernandes e Larsson (2000) estudaram equinos

submetidos a provas de enduro de 30km e encontraram redução da glicemia ao término do esforço. Dessa forma, o efeito do exercício sobre a concentração de glicose é variável dependendo da intensidade e duração do exercício (DERMAN & NOAKES, 1994).

Durante exercício sub-máximo de longa duração ocorre a depleção dos estoques de glicogênio intramuscular ou a hipoglicemia, secundária a depleção de glicogênio hepático, sendo esta a principal responsável pela fadiga (PAGAN et al., 2002). Com o exercício intenso, ocorre aumento da glicemia devido ao incremento da glicogenólise e neoglicogênese hepática provocadas pela ação tanto do cortisol (SIMÕES et al., 2003) como da atividade adrenérgica (Geor et al., 2000), devido a necessidade de aumento na demanda tecidual. Além dos efeitos do estresse que estimula a liberação de glicose por estímulo adrenérgico. O aumento da glicogenólise e do estresse pode ocorrer em consequência da duração prolongada do exercício (ROSE & HODGSON, 1994). Desta forma, as glicoses séricas e musculares são essenciais para a geração de energia via anaeróbica e aeróbica (LACOMBE; HINCHCLIFF; TAYLOR, 2003).

Fatores endócrinos como insulina, glucagon, epinefrina e norepinefrina são importantes reguladores do metabolismo da glicose durante o exercício (COGGAN, 1991). A redução na relação insulina/glucagon é o estímulo primário para a glicogenólise hepática, promovendo aumento da glicose durante o exercício de baixa intensidade em humanos. Pois outro fator que contribui para o efeito hiperglicemiante gerado no exercício é o bloqueio na liberação da insulina provocada pela ação de catecolaminas e cortisol.

Outros fatores importantes que interferem na resposta glicêmica após o exercício são o tempo decorrido da última refeição até o início do exercício e a hora do dia em que o exercício foi praticado, porque a glicemia é influenciada pelos hormônios pancreáticos e os mesmos são regulados pela digestão e absorção de carboidratos e pelo ciclo circadiano (SIMÕES, 2000). No entanto, o metabolismo da glicose durante o exercício é complexo sendo necessário mais estudos em equinos para esclarecer estes pontos. No presente estudo foi observado aumento significativo dos níveis de cortisol sérico após o exercício físico. O cortisol é frequentemente utilizado para avaliar os níveis de estresse induzidos pelo exercício (WELLHOENER et al., 2004; MALINOWSKI et al., 2006; FERLAZZO et al., 2009). O hormônio cortisol produzido pelo córtex adrenal é uma das principais substâncias químicas que indicam o nível de estresse (STRZELEC et al., 2011). O estresse provoca um aumento dos níveis de cortisol livre no plasma sanguíneo, cujas concentrações plasmáticas variam amplamente, e pode ocorrer dentro de um período de tempo muito curto (DICKSON et al., 1996). O estresse de qualquer tipo, incluindo os agentes ou estímulos nocivos que requerem uma adaptação do organismo, aumenta de modo acentuado os níveis de cortisol. O resultados do presente estudos permitem afirmar que a corrida foi um fator determinante na variação dos níveis de cortisol indicando ser um agente estressor.

A maioria dos estudos relata que o exercício agudo provoca aumento do cortisol tanto em humanos (WELLHOENER et al., 2004) como nos equinos (LINDEN et al., 1991; CAYADO et al., 2006; WELLHOENER et al., 2004; MALINOWSKI et al., 2006; FERLAZZO et al. 2009). Por exemplo, Wellhoener et al. (2004) relataram que os níveis de concentração de cortisol no corpo humano dobraram durante uma hora de exercício, enquanto Linden et al. (1991) demonstraram que os níveis de cortisol em cavalos

aumentaram após a corrida, salto e trote. Sendo que essa elevação está relacionada com a intensidade e a duração da atividade física. Nos exercícios curtos (4min), porém realizados em intensidades altas, a resposta do córtex da adrenal é menor quando comparada àquelas observadas com intensidades moderadas, mas ocorridas em exercícios de duração maior (12min) (NAGATA et al., 1999). Esses autores concluíram que a elevação do cortisol está mais relacionada à duração do que à velocidade (intensidade) do esforço.

Outra função do cortisol é controlar o metabolismo de carboidratos, na forma de glicogênio muscular e glicose plasmática que são importantes substratos mobilizados para a contração da musculatura esquelética (FERRAZ, 2010).

O cortisol sérico é o principal marcador de estresse em diversas espécies e também em equinos (MARTINEZ et al, 1988; SCHMIDT et al. 2009). Este hormônio se encontra em níveis aumentados tanto em situações de estresse físico quanto de estresse mental. O aumento do cortisol é uma resposta orgânica que protege o organismo permitindo respostas metabólicas, como a mobilização de energia, para adaptação aos diversos tipos de estresse. Em contrapartida, níveis mais elevados de cortisol teriam a função de limitar as respostas adaptativas podendo levar a efeitos deletérios.

No entanto, embora a mensuração do cortisol seja utilizada principalmente como marcador de estresse, sua mensuração pode ser usada como ferramenta na avaliação do treinamento imposto e de condicionamento físico. O treinamento físico tende a reduzir a magnitude de elevação do cortisol após provas e/ou exercícios (MARC et al., 2010). Podendo ser utilizado em estudos futuros para avaliação de condicionamento ou desempenho, seja por treinamento ou outras estratégias.

No presente estudo, os valores de lactato plasmático observados imediatamente após o exercício foram considerados altos demonstrando que a intensidade do exercício foi elevada o suficiente para promover estímulo metabólico. Existe uma correlação entre a concentração de lactato e a intensidade do exercício. Após 30 minutos foi observado queda da concentração de lactato, corroborando com Evans et al (1993), que observou queda de seus valores em 2-5 minutos após o término do exercício.

As citocinas inflamatórias IL-1 β foram extremamente baixas em todos os tempos não apresentando diferença significativa e as IL-6 não foram detectáveis. No presente estudo, não se pode afirmar que o exercício proposto não foi capaz de alterar as citocinas plasmáticas, haja vista que estas não foram detectáveis em nenhum momento, inclusive no basal. Uma hipótese é que a detecção tenha sido prejudicada pela escolha do tipo da amostra. As análises foram realizadas de amostras de plasma. Medições das concentrações plasmáticas de citocinas são difíceis pois há uma variedade de fatores, incluindo baixas concentrações no sangue (LIBURT, 2010). O sangue não é um tecido específico para as concentrações de citocinas, como as citocinas possuem uma meia-vida curta, sua atuação tende a se restringir a sua própria célula produtora ou a sua periferia imediata (ação parácrina).

Dessa forma, análise dos efeitos do exercício devem ser melhor observados em tecidos-específicos, como músculo. As investigações sobre o exercício de seres humanos têm se centrado na resposta das citocinas no músculo com um foco sobre o

papel na dor muscular e efeitos sobre o desempenho (PEAKE et al., 2005a, b NIEMAN et al. 2007).

A mesuração das citocinas utilizando biópsias musculares é mais direta no tecido de interesse, especialmente quando em comparação com as medições das concentrações plasmáticas de citocinas, como documentado por Liburt e colaboradores (2010), sendo este o primeiro trabalho que mostra a resposta de citocinas em equinos. Estes autores abordaram apenas a questão do efeito do exercício sobre aumentos na expressão de mRNA para citocinas em músculo e sangue analisados através de PCR e observaram que não houve alterações significativas no mRNA expressão de IL-1 no músculo ou IL-6 no sangue, o que corrobora com nosso estudo. Colahan et al. (2002) também relataram que o exercício agudo não alterou a expressão de mRNA para IL-2, IL-4, IL-6 Ou IL-10. No entanto, eles documentaram um efeito no mRNA para TNF-alfa e IL-1 aos 23 e 30 dias após o exercício.

Portanto, a falta de uma resposta de IL-6 no sangue de cavalos em exercício no presente estudo é consistente com os estudos no homem, e semelhante à resposta observada em outras investigações envolvendo cavalos que realizaram exercício de curto prazo (STRELTSOVA et al., 2006, LIBURT et al., 2009, LIBURT et al, 2010). Isso levou os pesquisadores a classificar IL-6 como uma "mioquina" ou uma citocina muscular, já que estudos baseados em humanos mostraram que a regulação da IL-6 ocorre no músculo mas não no sangue quando a intensidade ou a duração exercício físico causa um desafio metabólico sem danos musculares (NIEMAN et al., 1998, PEDERSEN et al., 2001).

No entanto, contrariando o presente estudo, Suagee e colaboradores (2013), em uma pesquisa para avaliar se há relação das citocinas pró-inflamatórias (TNF, interleucina IL -1b, IL-6) com escore de condição corporal (BCS) de 105 equinos, tiveram êxito nos resultados. As concentrações plasmáticas de IL-6 variaram de 2 para 1.588 ng / mL, e as concentrações plasmáticas de IL-1b variaram de 1 para 544 ng / mL, excluindo-se apenas 12 e 13 amostras, respectivamente que excederam limite de detecção do ensaio. E recentemente, Hall e colaboradores (2015), utilizando a técnica de imunoensaio de microesferas fluorescentes (FMIA) foram capazes de medir várias citocinas simultaneamente, inclusive a IL-6, numa única amostra. de plasma e soro de equídeos, usando o sistema BioPlex® 200. Eles demonstraram um aumento no número de citocinas detectáveis em relação aos estudos publicados anteriormente e indicam que esta tecnologia tem a vantagem em reduzir o volume da amostra e o tempo de ensaio comparado com ELISAs tradicionais. Dessa forma devemos considerar o tecido da amostra de eleição e a técnica da análise para a detecção de citocinas inflamatórias e assim ter maior êxito nos resultados.

Devido a marcada controvérsia existente, no que se refere à influência do sexo nos parâmetros hematológicos, endócrinos e autonômicos nos equinos foram realizadas análises comparativas entre machos e fêmeas. Análise dos resultados obtidos no que se refere à influência do sexo em resposta ao exercício físico proposto demonstra não existir diferenças entre machos e fêmeas em todos os parâmetros estudados.

Embora o presente estudo tenha sido planejado visando obter equinos Puro Sangue Inglês procedentes de uma amostra bastante homogênea, considerados numa faixa de idade bem definida e que se caracterizavam como animais de alto

desempenho em competições, foi realizada análise dos resultados obtidos no que se refere à influência da idade em resposta ao exercício físico. Os resultados mostram que não houve correlação entre a idade e nenhum parâmetro estudado em resposta ao exercício proposto.

No presente estudo combinamos a análise das respostas autonômicas, hematológicas e endócrinas para avaliar a reatividade dos animais a situações de estresse como o exercício físico. No entanto, não foi observado correlação entre os parâmetros estudados, apenas entre os parâmetros da VFC (FC, razão LF/HF, LF e HF). Dessa forma, apesar de se considerar que a avaliação de cada um desses parâmetros é uma ferramenta importante para analisar a reatividade ao estresse, quando usados sozinhos, não refletem as reações complexas do indivíduo ao estímulo. E apesar de compreender que as vias neurais que medeiam as respostas hematológicas, endócrinas e autonômicas estão conectados, nossos resultados mostram que essas respostas também podem ser dissociadas.

Desta forma o exercício a campo de alta intensidade e curta duração em cavalos de corrida foi capaz de promover alterações nos fisiológicas significativas, podendo ser utilizado como modelo de estresse físico nestes animais. Além disso, com a padronização deste modelo, podemos utiliza-lo em pesquisas futuras sobre a reatividade ao estresse físico em cavalos atletas.

1.5 CONCLUSÃO

- O exercício a campo de alta intensidade e curta duração (12 m/s, 4 min) foi capaz de produzir alterações fisiológicas características de estresse, uma vez que aumentou significativamente o hematócrito, as proteínas plasmáticas, a glicemia, o lactato e o cortisol em cavalos de corrida treinados.
- O exercício a campo de alta intensidade e curta duração (12m/s, 4 min) foi capaz de provocar alterações autonômicas indicativas de predomínio simpático sobre o parassimpático uma vez que, aumentou significativamente a frequência cardíaca, o componente de baixa frequência (LF) da variabilidade da frequência cardíaca e a razão LF/HF e diminuiu o componente de alta frequência (HF) em cavalos de corrida treinados.
- O exercício a campo de alta intensidade e curta duração (12/h, 4 min) não foi capaz de produzir alterações detectáveis nos valores das citocinas pro-inflamatórias IL1-b e IL-6 em cavalos de corrida treinados.
- Esse modelo pode ser utilizado em pesquisas futuras para discutir a reatividade dos animais a este tipo de estresse e para buscar mecanismos que possam alterar esta resposta e estratégias que possam minimizar os possíveis efeitos deletérios deste estímulo em cavalos.

CAPÍTULO II: EFEITO DA ACUPUNTURA NA RESPOSTAS DE ESTRESSE E NO DESEMPENHO DE CAVALOS DE CORRIDA SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO DE ALTA INTENSIDADE E BAIXA DURAÇÃO

RESUMO

A Acupuntura é uma técnica milenar da Medicina Tradicional Chinesa utilizada no tratamento e prevenções de doenças, que tem como objetivo auxiliar o corpo retornar ao seu estado de equilíbrio, através de estímulos em pontos específicos da corpo. Nas condições de estresse, o organismo age por meio da ativação e desativação de mecanismo de controle de várias funções para recuperar e manter a homeostase. O exercício físico representa o estímulo estressante mais fisiológico que existe, pois submete o organismo a desafios temporários na sua homeostasia. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da acupuntura em equinos através da análise de parâmetros fisiológicos antes e depois do exercício físico a campo de alta intensidade e curta duração. A pesquisa foi realizada no Jockey Club Brasileiro, Rio de Janeiro, Brasil. Foram utilizados 12 equinos da raça Puro Sangue Inglês, com idade entre 3 e 6 anos, experientes em provas de corrida. O exercício foi realizado a campo em pista de areia de 2.040m. O exercício consistiu em um aquecimento a trote a 4 m/s numa distância de 1.020 seguido de um galope a 12m/s, numa distância de 3,060m por 4 minutos (uma volta e meia na pista). Após o exercício, os equinos foram aleatoriamente divididos em dois grupos: CTL (C1):Controle e ACUP (C2)ACUP (C2): Acupuntura nos pontos VG1, C7, VG20 e B52 por 20 minutos durante 10 semanas. Após o período de tratamento os animais repetiram o mesmo exercício. Foram utilizados frequencímetro cardíaco Polar Equine™ para análise da VFC e as amostras de sangue foram coletadas antes e, imediatamente, imediatamente, 2h, 4h, 6h, e 24h após o fim do exercício. A acupuntura reduziu o aumento da razão LF/HF ($p < 0,05$), LF ($p < 0,05$) e a diminuição do HF ($p < 0,05$), promovendo uma recuperação mais rápida dos animais. No entanto, não influenciou os demais parâmetros analisados. Dessa forma, pode-se concluir que acupuntura tem um efeito modulador da resposta autonômica de cavalos para estressores, como o exercício físico.

Palavras-chave: estresse, variabilidade da frequência cardíaca, glicose, lactato, cortisol, citocinas inflamatórias

2.1 INTRODUÇÃO

O cavalo atleta é frequentemente sujeito a treinamento intenso, confinamento, transporte por longas distâncias, descanso insuficiente entre competições ou após longo período de viagem, o que o leva a apresentar elevada sensibilidade a diferentes estressores, sejam estes ambientais ou relacionados aos exercícios propriamente ditos. Todos esses fatores podem interferir no desempenho de um cavalo atleta e requerem atenção especial (TEIXEIRA, 2002). Além disso, esta alta sensibilidade ao estresse está relacionada à maior incidência de doenças infecciosas, úlceras gástricas, alterações comportamentais (desenvolvimento de estereotípias, mordedura, agressividade, depressão, perda de apetite). Desta forma, o controle dos níveis de estresse pode ser fundamental para um bom desempenho do cavalo atleta; e cada vez mais tem se buscado alternativas terapêuticas para diminuir as reações deletérias induzidas pelas respostas aos estímulos estressores.

No cavalo atleta o uso de medicamentos deve ser avaliado com maior cautela já que pode ser considerado *dopping*. Vale lembrar que a administração de qualquer substância em cavalos que possa modificar sua performance durante uma prova desportiva é considerada *dopping*. A Acupuntura vem sendo utilizada amplamente em casos de alterações comportamentais e físicas decorrentes do estresse em humanos e em animais. Além disso, a técnica possui a vantagem de não produzir os efeitos colaterais observados no tratamento convencional e ser permitida pela Federação Equestre Internacional (FEI) em competições.

A história da acupuntura veterinária está envolta por lendas antigas sobre o Imperador *Fusi*, que uniu as sociedades primitivas, formando a civilização chinesa. Isso teria ocorrido há cerca de 10.000 anos, no período de domesticação de animais que incluía atividades como o tratamento de animais doentes. A importância dos animais na sociedade agrária é indiscutível e ganha mais destaque no Período das Guerras durante a Dinastia *Chou* (475 AC a 221 AC) quando os exércitos necessitavam de médicos para seus cavalos (LIN et al., 2003). Um registro histórico marcante é a escultura em rocha da Dinastia Han (206 AC a 220 DC) que mostra soldados fazendo AP com flechas em seus cavalos para estimulá-los antes das batalhas (KIM et al., 2005; PITTLER & ERNST, 2006; SCHOEN, 2006; XIE & PREAST, 2007).

A prática da acupuntura veterinária em nosso país é recente e seu primeiro registro data de 1981 e descreve o uso da eletroacupuntura analgésica em cirurgias abdominais em cães. Mas antes disso, em 1978, o Professor Paulo Iamaguti da FMVZ, UNESP, Botucatu já utilizava a técnica em partos distócicos e cirurgias de piometra em cadelas. Um dos principais incentivadores do estudo da acupuntura veterinária no Brasil foi o Professor Tetsuo Inada, no Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em meados da década 1980. Nesse período, a escassez de literatura fazia com que o “Mestre Tetsuo” ensinasse por transposição, utilizando mapas para humanos. Muitos colegas iniciaram a prática clínica da acupuntura em animais, contribuindo quase que anonimamente para sua difusão (SCOGNAMILLO-SZABÓ et al., 2006).

O termo acupuntura é derivado dos radicais latinos "acus e pungere", que significa agulha e punção. A acupuntura pode ser definida como a inserção de agulhas em pontos específicos no organismo para gerar um efeito terapêutico ou homeostático

(XIE; PREAST, 2007). Na MTC, a acupuntura inclui o uso de agulhas finas (agulhas secas), hemopuntura, moxabustão, pneumoacupuntura, aquapuntura, eletroacupuntura, acupressão, aquecimento, entre outros (XIE; PREAST, 2007).

O ponto de acupuntura, conhecido como acuponto, é definido geralmente como um ponto da pele com sensibilidade espontânea ao estímulo, caracterizado por resistência elétrica reduzida (HWANG; EGERBACHER, 2001). Muitos acupontos estão situados em depressões superficiais nas junções musculares e são áreas cutâneas providas de concentrações altas de terminações nervosas livres, plexos nervosos, mastócitos, vasos linfáticos, arteríolas e vênulas (HARMAN, 1993; LUNA, 1998).

Embora a pele sobre o acuponto possa mostrar baixa resistência elétrica, na maioria dos tratamentos por acupuntura a profundidade de inserção das agulhas se estende além da espessura da pele e alcança estruturas subcutâneas de hipoderme, fáscia, músculo ou outras estruturas. Quando essas estruturas são estimuladas por agulhas de acupuntura pode-se evocar uma sensação única conhecida como *Deqi* (captura de energia vital). Acredita-se que a sensação de *Deqi* seja essencial à obtenção dos efeitos terapêuticos da acupuntura (SHOEN, 2006)

Na medicina ocidental contemporânea, a acupuntura é considerada uma forma de estimulação sensorial que afeta várias classes de fibras nervosas aferentes e uma vez direcionado para a medula espinhal e os centros superiores do SNC, desencadeia os eventos neurofisiológicos que geram o resultado terapêutico (SOLIGO et al, 2013). Os estímulos gerados pela acupuntura podem ativar os centros autônomos e hipotalâmico-hipófise- Adrenal (HPA) e, desse modo, auxiliar na manutenção homeostase e melhorar a eficiência de vários sistemas do organismo (LI et al, 2013). Portanto, muitos dos conceitos preconizados pela MTC passaram a ter um fundamento científico, e através de pesquisas neurofisiológicas tem-se explicado muitos dos efeitos da acupuntura, por meio da teoria neural não opióide, teoria humoral, da bioeletricidade e relações somatoviscerais (HARMAN, 1993, SHOEN, 2006). A teoria neural não opióide implica na inibição de impulsos conduzidos por fibras nervosas, sendo que o efeito da acupuntura depende dos sistemas nervosos periférico e central. Já a teoria humoral é baseada na evidência de que a acupuntura estimula a liberação de opióides endógenos. Este mecanismo age em vários locais do sistema nervoso central, inibindo a percepção dolorosa e a transmissão da dor da medula espinhal por meio de inibição descendente (SHOEN, 2006).

Dessa forma, em termos fisiológicos, a acupuntura procura restabelecer o equilíbrio entre estados contraditórios de função e a homeostase. Sob a ótica da MTC, isso ocorre porque a acupuntura alterna os estados de energia e com isto mantém a organização ideal do órgão e do organismo a ser tratado (DRAEHMPAEHL & ZOHMANN, 1997). Pela MTC, a energia flui através do organismo ao longo dos canais específicos ou meridianos. Estes meridianos fazem a comunicação entre órgãos e extremidades, e através deles que as funções fisiológicas do organismo são reguladas e o equilíbrio é mantido. Existem 14 meridianos principais, sendo 12 deles bilaterais e correspondentes a cada órgão Zang-Fu, e outros dois que circulam nas linhas médias dorsal e ventral. Ao longo de cada meridiano existem pontos específicos onde as agulhas de acupuntura são inseridas (MACIOCIA, 2007). O sistema de meridianos é utilizado para fazer diagnóstico e desenvolver planos de tratamentos para ampla variedade de condições patológicas. Os demais fatores, como Yin Yang, energia,

sangue e órgãos Zang Fu, devem estar em equilíbrio para que haja saúde. O organismo deve também manter o equilíbrio com o ambiente externo (CAIN, 2003).

O mecanismo da acupuntura proposto é baseado no princípio de manter ou recuperar a homeostase. Muitos esforços têm sido feitos para estabelecer adequadamente as propriedades e características desses mecanismos em termos de neuroanatomia, neurofisiologia e neuroquímica (TIRGOVISTE, 1975; YAMAMURA, 1993).

Esta terapia vem sendo utilizada amplamente em casos de alterações comportamentais e físicas decorrentes do estresse em humanos e animais. A acupuntura leva ao alívio de tensão muscular, melhora do fluxo sanguíneo local, controla a dor e modulação do sistema nervoso autônomo (BARLAS et al, 2000; KNARDAHL et al, 1998). Além disso, essa terapia tem sido utilizada para tratamento de lesão, diminuição da fadiga e melhoramento do condicionamento atlético em humanos (KARVELAS et al, 1996).

A acupuntura vem se destacando no cenário desportivo com a finalidade de melhorar o desempenho de atletas, porém seus benefícios não foram totalmente elucidados nesse contexto, no entanto, já se conhece seus benefícios tanto físicos quanto mental aos praticantes de atividade física. Para o tratamento, são sugeridos pontos específicos para melhorar o desempenho físico, esportivo e a plasticidade muscular (PIRES 2010; PELLEGRINOTTI, 2004).

Existem ainda poucos estudos experimentais com acupuntura na melhora do desempenho físico. Em contrapartida, tem sido aproveitada por atletas, profissionais e amadores para promover bem-estar físico, para o alcance de um nível mais alto de desempenho competitivo e para um melhor treinamento (BELMIRO et al, 2013).

Cayado e colaboradores (2006) sugerem que cavalos envolvidos em competição são um bom modelo para o estudo da resposta ao estresse induzida pelo exercício e que esse modelo pode ser utilizado em pesquisas futuras em busca de novos fármacos e terapias ansiolíticas ou até mesmo conduzir à descoberta de moléculas endógenas ansiolíticas em cavalos.

Nas últimas décadas, aumentou a busca por terapias que ajudassem na cura e na melhora do desempenho de equinos. E para satisfazer essas exigências, a acupuntura equina evoluiu e se expandiu. Hoje, a acupuntura é usada para tratar cavalos de diversas funções, incluindo cavalos de corrida, de rédeas, de enduro, de salto, de adestramento e várias outras atividades (SHOEN, 2006).

As investigações científicas ocidentais sobre os mecanismos e a eficácia dessa terapia em equinos ainda são escassas (RIZZO et al., 2017). Existem alguns trabalhos que demonstram a eficácia da acupuntura no tratamento de dor lombar crônica que é uma das principais causas de queda de desempenho, melhorando o desempenho da maioria dos cavalos atletas após 10 sessões de acupuntura em média, seja por acupuntura tradicional, eletroacupuntura, aquapuntura ou laser em pontos localizados na musculatura lombar (MARTIN; KLIDE, 1987; KLIDE; MARTIN, 1989).

Outros trabalhos demonstram o efeito da acupuntura no desempenho atlético de equinos. Segundo Harman (1997), a acupuntura, combinada ao correto encilhamento, casqueamento e técnicas de montaria melhora o desempenho. Essa melhora atinge aproximadamente 85 a 90% dos equinos tratados, retornando ao mesmo nível, ou nível superior do desempenho original, após cerca de um a quatro tratamentos com

acupuntura. Angeli & Luna (2008) observaram que o tratamento com aquapuntura nos pontos Bai Hui, VB 27, E30 e BP13, duas vezes por semana durante 3 semanas, foi capaz de melhorar a capacidade metabólica de cavalos Puro-Sangue Inglês após corrida, embora não tenha influenciado as enzimas musculares e a capacidade cardiovascular. Em outro estudo realizado por esses mesmos autores também em 2008, o mecanismo de ação da aquapuntura não influenciou os valores hematológicos e de cortisol em cavalos da raça puro-sangue-inglês em provas de corrida, entretanto, apesar dos resultados encontrados não demonstrarem a via de efeito da aquapuntura sobre o desempenho de equinos atletas, pôde-se observar que: os animais do grupo controle e do grupo falsa-acupuntura obtiveram uma vitória cada um antes dos tratamentos e uma após, permanecendo na mesma média de vitórias por grupo. Já, no grupo da aquapuntura, nenhum animal havia apresentado vitórias antes do tratamento, sendo que cinco dos seis atletas tratados apresentaram pelo menos uma vitória após o período de tratamento. Rizzo e colaboradores (2017) que avaliaram o efeito da acupuntura no lactato, glicose, hemoglobina, hematócrito, volume corpóreo médio e fragilidade osmótica dos eritrócitos (EOS) observaram que o tratamento promoveu o aumento dos valores de glicose no sangue e na redução do lactato e níveis de EOF após prova de corrida sugerindo seu papel na melhoria da adaptação fisiológica. Outros comprovam a eficácia dessa terapia também como tranquilizante e anti-estresse em equinos (LUNA et al., 2006; GODOI et al., 2011; VILLAS-BOAS et al., 2016; RIZZO et al., 2017).

Com base na hipótese de que estimulação de pontos AG pode melhorar as respostas de estresse e, conseqüentemente, melhorar a adaptação do organismo nessas situações e dessa forma melhorar o desempenho e recuperação do cavalo atlético, o objetivo do nosso estudo é verificar o efeito do tratamento por acupuntura em alguns parâmetros hematológicos, bioquímicos, autonômicos e endócrinos de cavalos de corrida após exercício a campo de alta intensidade e baixa.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 12 equinos, machos (8) e fêmeas (4), com idade entre 3 e 6 anos, da raça Puro Sangue Inglês, pesando entre 450 - 550 kg, provenientes de um mesmo proprietário e mesmo treinador alocados no Jockey Club Brasileiro. Todos os animais estavam sendo utilizados como cavalos de corrida, com protocolo intenso de treinamento e participação frequente em competições. Os animais ficam confinados em baias com dimensões de 4mx4m, com passeios no cabresto duas vezes ao dia. Todos os animais possuem uma mesma rotina de manejo tornando o grupo bastante homogêneo. Todos os animais foram considerados saudáveis após exame clínico e liberação da veterinária responsável. Sendo que quatro animais que participaram do experimento 1 foram retirados do presente experimento porque se lesionaram (2) e tiveram treinos diferentes (2). Todos os procedimentos foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biologia da UFRRJ (CEUA/IB/UFRRJ) (nº 16/2015) e estão de acordo com as normas internacionais de uso de animais em pesquisa.

Protocolo experimental

O experimento foi realizado em dois dias consecutivos, utilizando 6 animais em cada dia, iniciando às 4:00h com as coletas basais.

Em cada animal, em sua respectiva baia, foi realizada a colocação do frequencímetro cardíaco (Polar Equine™) ao redor do tórax e ativado. Após a ativação do frequencímetro foi realizada a coleta de sangue para a análise de Hematócrito, Cortisol, Glicose, Lactato e Citocinas Inflamatórias (IL-1 β e IL-6). Após a realização de todas as coletas, os animais foram encilhados e em seguida, foram levados para a pista de areia para corrida de alta intensidade e curta duração (Corrida AICD) onde fizeram o aquecimento que consistiu num trote a 4 m/s em meia pista (1020m) e em seguida foram submetidos ao exercício submáximo que consiste numa corrida de 3.060 m de distância e velocidade média de 12 m/s. A velocidade foi controlada tanto pelo jôquei utilizando um aparelho de GPS (Garmin) quanto pelo treinador utilizando um cronômetro. Foram realizadas coletas imediatamente, 30 minutos, 2h, 4h, 6h e 24h após o exercício. Após a corrida, aqui chamada de Corrida 1, os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos: Acupuntura (ACUP C1) e Controle (CTL C1). Os animais do grupo acupuntura passaram por tratamento por acupuntura semanais durante 10 semanas (descrito a seguir), enquanto que os animais do grupo controle não receberam qualquer tratamento por acupuntura. Após as 10 semanas de tratamento, os animais foram submetidos a uma nova corrida, aqui chamado de corrida 2. onde os grupos passaram a ser chamados ACUP C2 e CTL C2. O protocolo experimental da corrida 2 foi exatamente idêntico ao da corrida 1.

Durante o período de tratamento (10 semanas) os animais seguiram com a mesma rotina de treinamento que tinham anteriormente ao experimento. O treinamento foi definido pelo próprio treinador devido ao fato desses animais serem atletas de alta desempenho. O treinamento está descrito a seguir:

- Treinos diários consistindo em aquecimento a trote por 1020m seguida de corrida de 3.060 m a uma velocidade média de 6m/s ou 22,5 km/h (podendo variar de 20 a 25 km/h) na pista de areia.
- Um treino pesado semanal, consistindo em aquecimento a trote por 1020m seguida de corrida de 3.060 m a uma velocidade média de 15 m/s ou 52,5 km/h (podendo variar de 50 a 55 km/h) na pista de areia.
- No dia seguinte ao treino pesado, trabalho ao passo com o animal sendo conduzido no cabresto em pista de asfalto por 15 minutos.

O treino apenas apresenta variação para animais lesionados ou recém recuperados de lesão que se exercitam na piscina ou para animais que apresentam conformação menor ou considerados mais sensíveis que ao invés de treinamento diário fazem treinos em dias intercalados.

No presente estudo não foram utilizados animais em recuperação recente de lesão. E os animais que se lesionaram durante o período das 10 semanas (n=2) foram retirados do experimento. Dessa forma, nenhum animal fez exercício na piscina durante o período do experimento. Apenas 2 animais apresentaram treino diferenciado (intercalado) e foram excluídos do experimento.

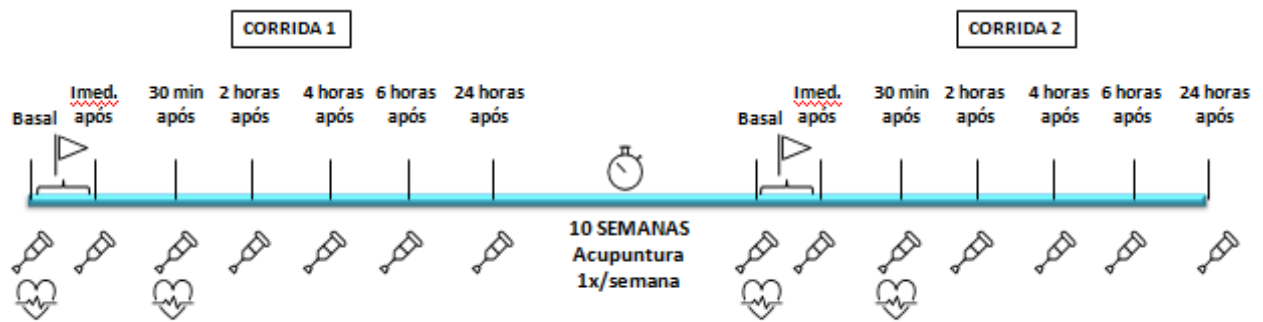
Após competição, os animais possuem dois dias de descanso.

As variáveis referentes a cada animal que poderiam interferir nos resultados estão apresentados na tabela 1. Foi observado que a diferença sexual e a idade dos animais no presente estudo não interfere nos parâmetros analisados (figura 13 e 14 do capítulo 1). Os animais com treino diferenciado foram excluídos do experimento para evitar possíveis influências no resultado. Em relação ao número de competições, apenas dois animais tiveram números de participações diferentes, mas como esses animais pertenciam a grupos diferentes foram então mantidos no experimento.

Tabela 1: Apresentação das variáveis referentes de cada animal.

Animal	Sexo	Idade	Treino	Competições
CTL 1	M	3	Diário	2
CTL 2	M	6	Diário	2
CTL 3	F	4	Diário	2
CTL 4	F	4	Diário	2
CTL 5	F	6	Diário	3
CTL 6	M	6	Diário	2
ACUP 1	M	4	Diário	3
ACUP 2	M	3	Diário	2
ACUP 3	M	3	Diário	2
ACUP 4	M	3	Diário	2
ACUP 5	M	5	Diário	2
ACUP 6	F	3	Diário	2

O protocolo experimental está esquematizado abaixo:



Legenda:

- CORRIDA – Aquecimento + Galope (3.060m a 12m/s na pista de areia)
- Coleta de sangue
- Mensuração da Variabilidade da Frequência Cardíaca

Figura 15: Esquema do protocolo experimental do efeito da acupuntura em equinos submetidos ao exercício de alta intensidade e curta duração

Tratamentos

Os animais foram divididos em dois grupos de tratamentos:

- **CTL C2** (grupo Controle submetidos a corrida 2), os animais permaneceram sem manipulação por 10 semanas (n=6)
- **ACUP C2** (grupo tratado com agulhas em pontos de acupuntura (acupontos) antes de serem submetidos a corrida 2), os animais receberam agulhas esterilizadas de aço inox 0.30x40mm, marca Dongbang com a profundidade de 2 cm nos pontos VG1 (Vaso Governador 1), C7 (Coração 7), VG20 (Vaso Governador 20) e B52 (Bexiga 52) durante 20 minutos, semanalmente, por 10 semanas (figura 16 e 17) (n=6).

Tabela 2: Localização, inervação e indicação dos pontos de acupuntura utilizados.

Acuponto	Localização	Substrato Anatômico	Indicação Tradicional
VG-1 (HouHai) Mar de Trás	Ponto médio entre a cauda e o ânus, na prega anocaudal.	Área rica em tecido conjuntivo frouxo, inervada pelos ramos ventrais dos nervos sacral e coccígeo, originados no plexo lombossacral. Nervos sensitivos e motores	Nervosismo, agitação e acalma a mente Alterações na porção final do intestino grosso
VG20 (Bai Hui) Os Cem encontros	Na linha média, no ponto mais alto da fronte, rostral a crista do occipital;	Ramificações dos nervos supra-orbitário, occipital maior e aurículo-palpebral	Reunião dos meridianos Yang, acalma a mente
C7 (ShenMen) Portão do Espírito	A localização superficial está numa depressão na superfície medial do rádio, cranial a inserção do músculo flexor ulnar do carpo, ao nível do aspecto dorsal do músculo acessório do carpo. A localização mais profunda é entre os músculos flexor ulnar do carpo e o flexor digital superficial.	Ramificações do nervo cutâneo antebraquial medial, com fibras do oitavo nervo cervical e as ramificações palmares do nervo ulnar	Acalma o Espírito, regula a pressão arterial O coração é responsável pelo equilíbrio emocional
B52 (Zhishi) Morada da Vontade	Localizado a 6 cun (unidade de medida relativa na utilizada na MTC, onde 1 cun equivale, no caso dos equinos, à largura da costela flutuante à linha média dorsal, na altura dos processos espinhosos da 2ª e 3ª vértebras lombares	Ramificações dorsais do segundo nervo lombar	Tonifica a Essência, beneficia a região lombar Controla o medo. Reforça a vontade.

(MACIOCIA, 1996; SCHOEN, 2006; IVAS (Internacional Veterinar Acupuncture Society).

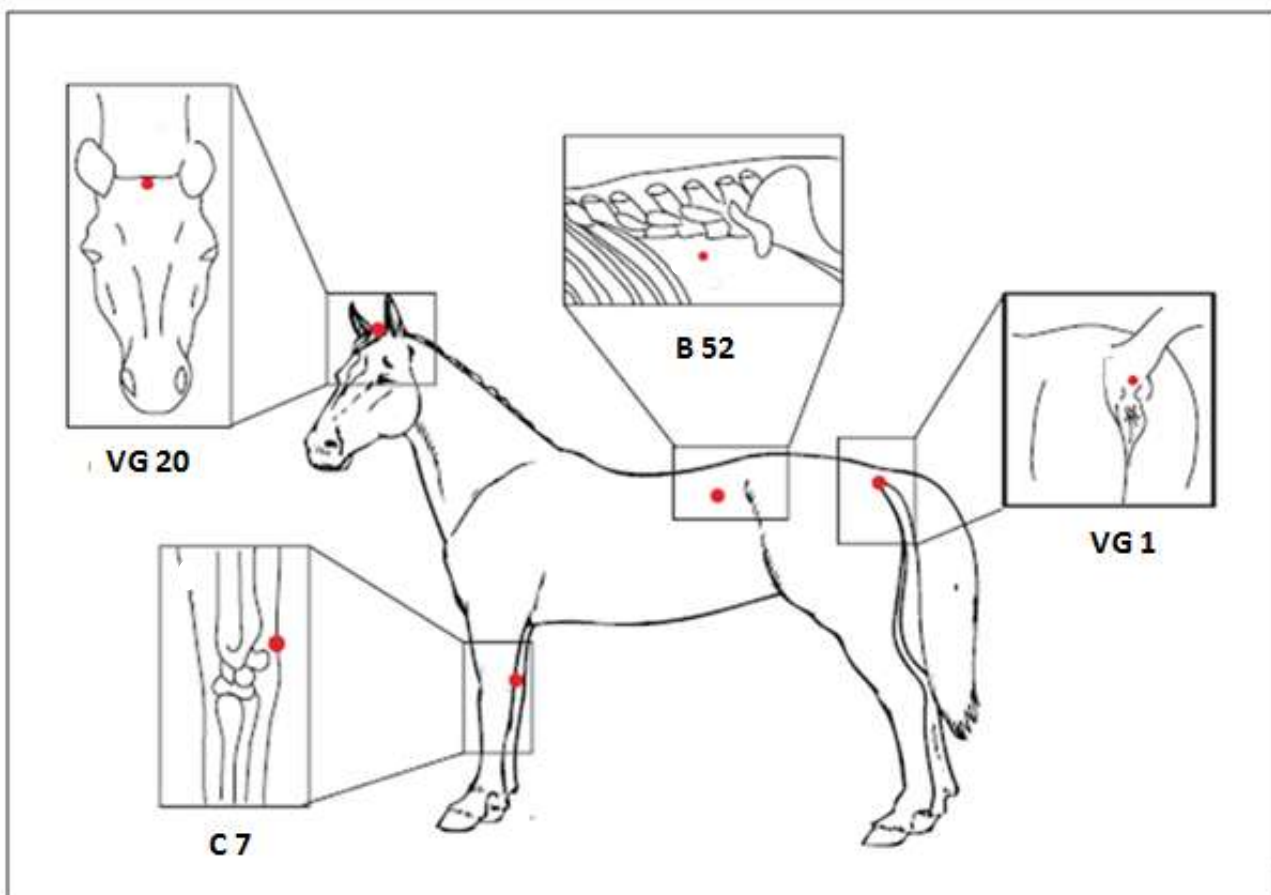


Figura 16: Localização dos pontos VG20, C7, B52 e VG1 em equinos. Fonte: Villas-Boas, 2016



Figura 17: Equino submetido ao tratamento de acupuntura: aplicação da agulha no ponto VG1

Coletas de sangue

Como descrito no capítulo anterior, as coletas foram feitas nos momentos basal, imediatamente após, 2h, 4h, 6h e 24h após a corrida.

Uso de Frequencímetros e Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca

Como descrito no capítulo anterior.

Análise do Lactato e Glicose

Como descrito no capítulo anterior.

Análise de Cortisol

Como descrito no capítulo anterior.

Análise de Citocinas

Como descrito no capítulo anterior.

Análises Estatísticas

As variáveis da VFC (FC, LF/HF, LF e HF), hematócrito, glicose, lactato, cortisol e citocinas foram analisadas pela ANOVA de duas vias para medidas repetidas com as variáveis repetidas (efeito da exercício: basal e pós-corrida) e dia da corrida (dia1 (antes e dia 2 (depois) do tratamento) e grupo (CTL e ACUP). As análises estatísticas foram realizadas com SPSS Versão 21 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) utilizando intervalo de confiança de 95% e probabilidade de 5%. Os gráficos foram construídos usando GraphPad Prism 5.0 (Software GraphPad).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 VFC

A corrida de alta intensidade e curta duração foi capaz de aumentar a frequência cardíaca (fator efeito da corrida: Wilks`Lambda =0.193; $F_{(1, 10)} =41,903$, $p<0,001$) e a razão LF/HF (fator efeito da corrida: Wilks`Lambda =0,638; $F_{(1, 10)} =5.676$, $p=0,038$), mas não produziu efeito significativo no LF e no HF. Quando avaliamos o efeito do dia da corrida, ou seja se a corrida 1 foi diferente da corrida 2 (independente de outros fatores) observamos que em nenhum dos parâmetros de VFC houve diferença significativa. Quando avaliamos o efeito do grupo, ou seja se acupuntura alterou a resposta induzida pela corrida, a ANOVA detectou significância na razão LF/HF (fator efeito da corrida x dia da corrida x grupo: Wilks`Lambda =0.623; $F_{(1, 11)} =6.046$; $p=0,034$), o que indica que a acupuntura reduziu o aumento da razão LF/HF induzido pela corrida. Nos demais parâmetros da VFC não foi detectada diferença significativa (figura 18).

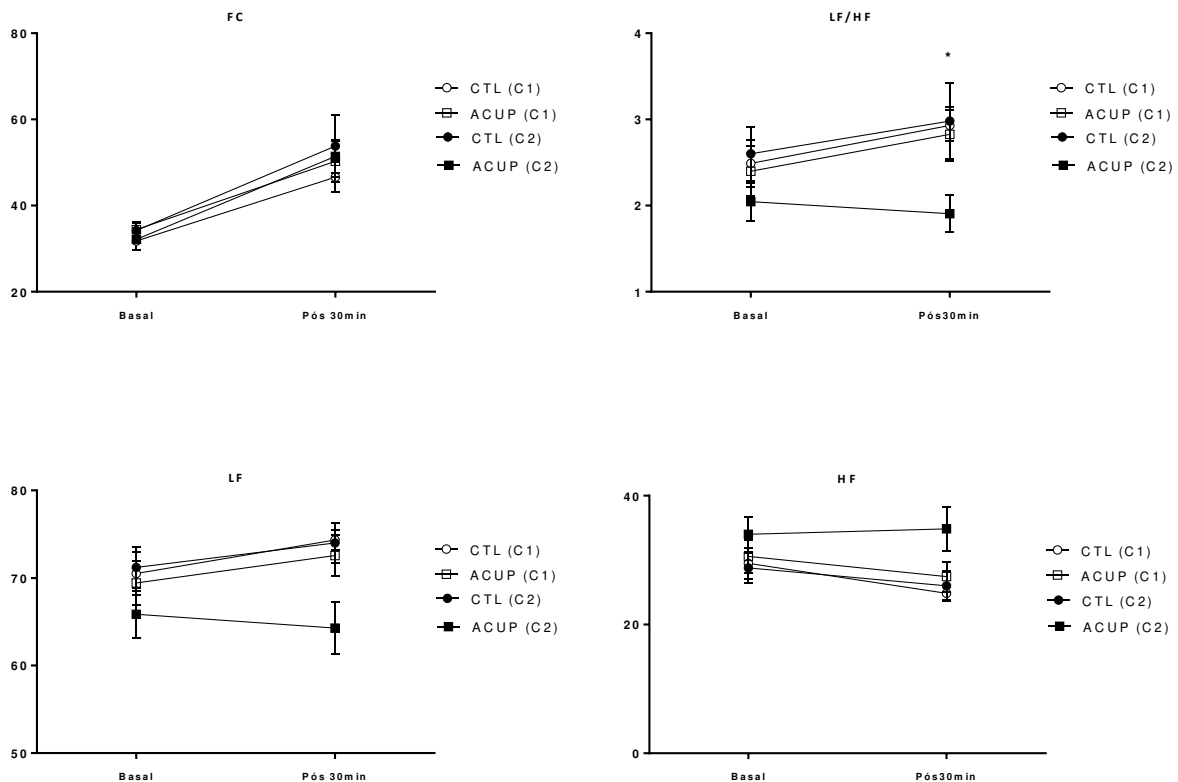


Figura 18: Efeito da acupuntura na VFC de equinos submetidos ao exercício a campo de alta intensidade e baixa duração. Os dados são apresentados como média \pm epm nos momentos Basal e 30 min após o exercício (Pós 30min). Antes os equinos foram tratados com acupuntura por 20 min durante 10 semanas nos pontos VG1, VG20, C7 e B52 (ACUP) e não tratados (CTL). **Em A**, efeito da acupuntura na Frequência Cardíaca Média. Não houve diferença significativa entre os grupos. **Em B**, efeito da acupuntura na VFC, expressa pela razão LF/HF. (*) indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). O grupo ACUP T2 apresentou razão LF/HF significativamente menores que os grupos CTL

(C1), CTL (C2) e ACUP (C2). **Em C**, efeito da acupuntura na VFC, expressa pelo componente de baixa frequência LF. (*) indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). O grupo ACUP T2 apresentou LF significativamente menores que os grupos CTL (C1), CTL (C2) e ACUP (C2). **Em D**, efeito do exercício na VFC, expressa pelo componente de alta frequência HF. (*) indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). O grupo ACUP T2 apresentou HF significativamente maior que os grupos CTL (C1) e CTL (C2). As variáveis foram analisadas pela ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida de postest de comparação múltiplas de Bonferroni.

2.3.2 Hematócrito

A corrida de alta intensidade e curta duração foi capaz de aumentar o hematócrito (fator efeito da corrida: Wilks`Lambda =0.033; $F_{(1, 10)} = 293,937$, $p < 0,001$). Não foi detectada nenhuma diferença significativa no fator dia da corrida, ou seja o hematócrito da corrida 1 foi semelhante ao da corrida 2. Não foi detectada nenhuma diferença significativa no fator grupo, a acupuntura não alterou o aumento do hematócrito induzido pela corrida (figura 19).

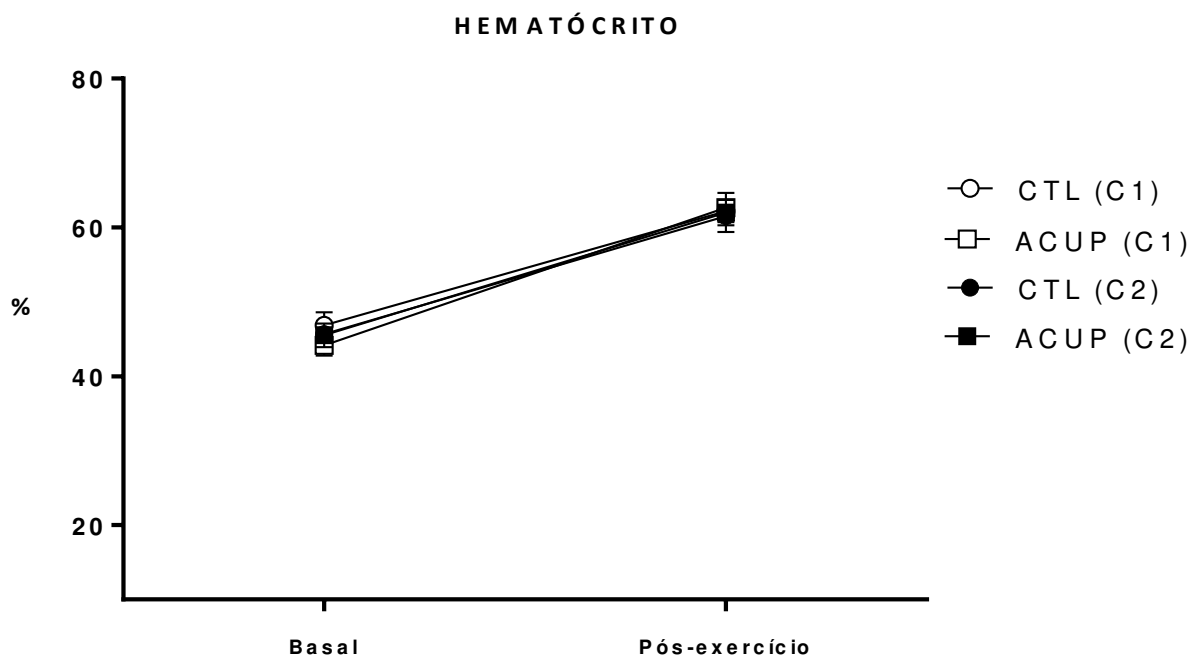


Figura 19: Efeito da acupuntura no hematócrito de equinos submetidos ao exercício a campo de alta intensidade e baixa duração. Os dados são apresentados como média \pm epm nos momentos Basal e imediatamente após o exercício. Antes os equinos foram tratados com acupuntura por 20 min durante 10 semanas nos pontos VG1, VG20, C7 e B52 (ACUP) e não tratados (CTL). Não houve diferença significativa entre os grupos. Apenas foi constatado diferença significativa no fator tempo. A variável estudada foi analisada através da Anova de duas vias para medidas repetidas seguidas por postest de comparação múltiplas de Bonferroni.

2. 3.2 Lactato

A corrida de alta intensidade e curta duração foi capaz de aumentar o lactato imediatamente após a corrida (fator efeito da corrida: Wilks`Lambda =0.029; $F_{(2, 10)} = 164.503$, $p < 0,001$). Não foi detectada nenhuma diferença significativa no fator dia da corrida, ou seja os valores de lactato do corrida 1 não foram diferentes dos valores da corrida 2. Não foi detectada nenhuma diferença significativa no fator grupo, ou seja acupuntura não alterou o aumento do lactato induzido pela corrida (figura 20).

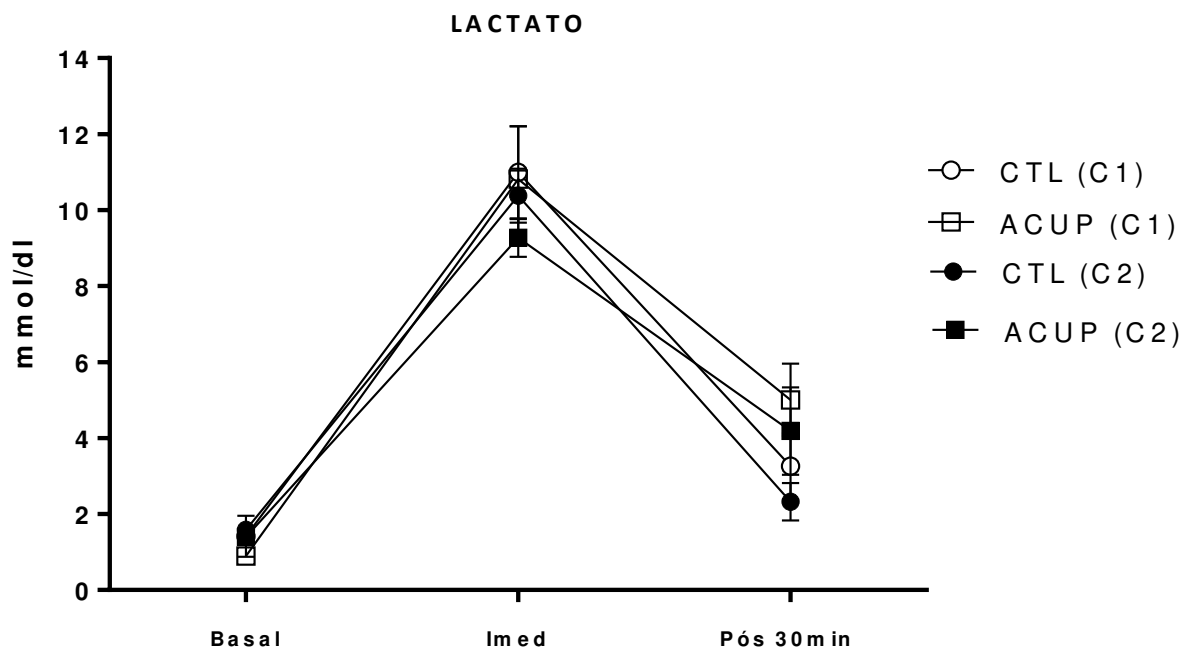


Figura 20: Efeito da acupuntura no lactato de equinos submetidos ao exercício a campo de alta intensidade e baixa duração. Os dados são apresentados como média \pm epm nos momentos Basal, imediatamente (Imed) e 30 min após o exercício. Antes os equinos foram tratados com acupuntura por 20 min durante 10 semanas nos pontos VG1, VG20, C7 e B52 (ACUP) e não tratados (CTL). Não houve diferença significativa entre os grupos. Apenas foi constatado diferença significativa no fator tempo. A variável estudada foi analisada através da Anova de duas vias para medidas repetidas seguida por postest de comparação múltiplas de Bonferroni.

2.3.3 Glicose

Como os valores basais dos grupos foram visualmente diferentes, estes valores foram considerados como co-fatores na análise estatística. A corrida de alta intensidade e curta duração foi capaz de aumentar a glicemia imediatamente após a corrida (: Wilks`Lambda =0.186; $F_{(2, 10)} = 15,344$, $p = 0.003$). Foi detectada diferença estatística ($p < 0,001$) do efeito dia da corrida nas alterações da glicemia induzidas pela corrida (fator dia corrida x corrida: Wilks`Lambda =0.134; $F_{(2, 10)} = 22,576$, $p < 0,001$). Não foi detectada nenhuma diferença significativa no fator grupo, ou seja acupuntura não alterou o aumento da glicemia induzido pela corrida (figura 21).

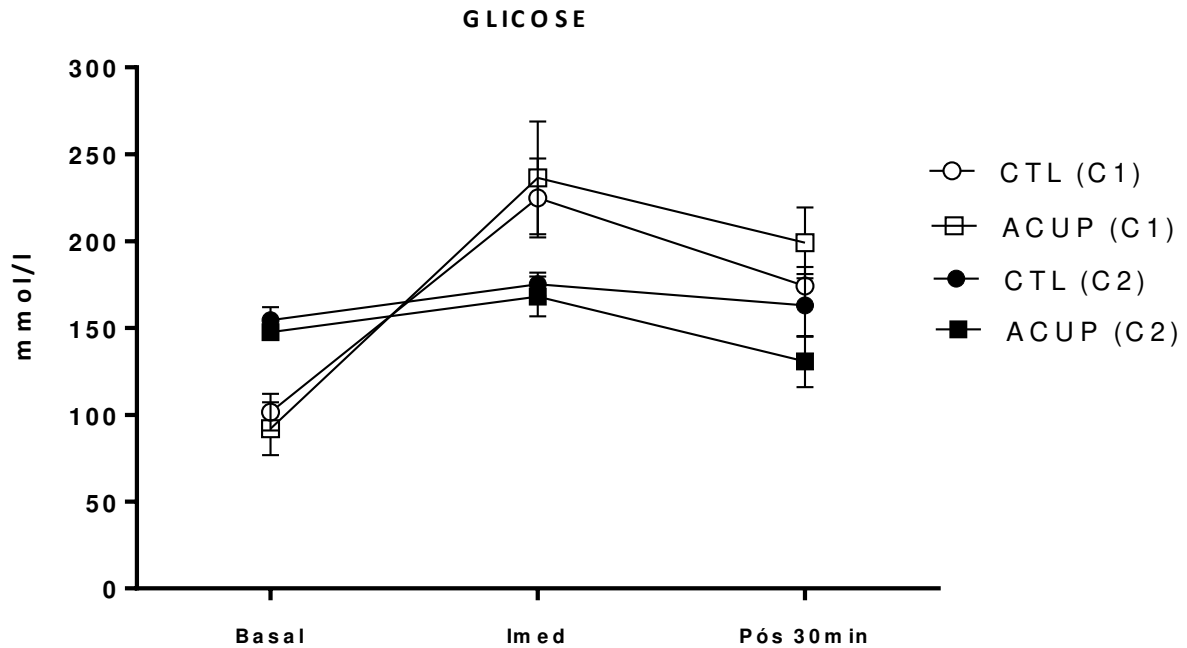


Figura 21: Efeito da acupuntura na glicose de equinos submetidos ao exercício a campo de alta intensidade e baixa duração. Os dados são apresentados como média \pm epm nos momentos Basal e imediatamente após o exercício. Antes os equinos foram tratados com acupuntura por 20 min durante 10 semanas nos pontos VG1, VG20, C7 e B52 (ACUP) e não tratados (CTL). Não houve diferença significativa entre os grupos. Houve apenas diferença significativa no tempo. As variáveis estudadas foram analisadas mediante o programa estatístico SPSS Versão 21 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

2.3.4 Cortisol

A corrida de alta intensidade e curta duração foi capaz de aumentar o cortisol 30 minutos após a corrida (: Wilks`Lambda =0,189; $F(2, 10) =21,514$, $p<0,001$). Foi detectada diferença estatística ($p<0,001$) do efeito dia da corrida nas alterações do cortisol induzidas pela corrida (Wilks`Lambda =0,705; $F(2, 10) =4,602$, $p<0,05$). Não foi detectada nenhuma diferença significativa no fator grupo, ou seja acupuntura não alterou o aumento do cortisol induzido pela corrida (figura 22).

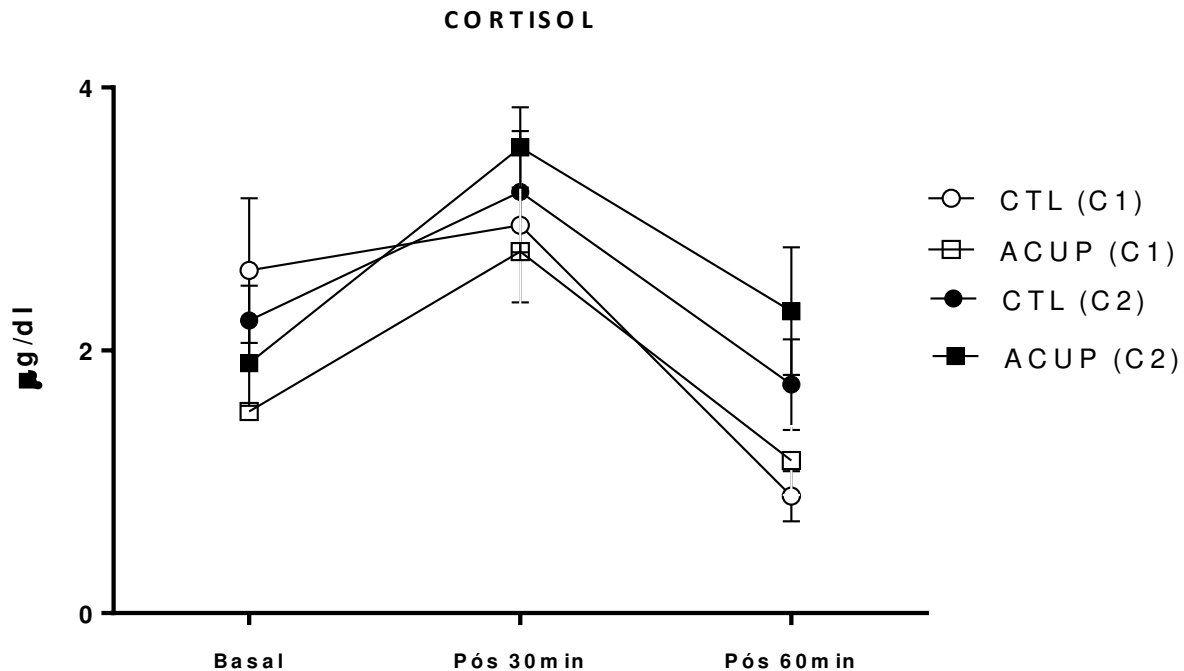


Figura 22: Efeito da acupuntura no lactato de equinos submetidos ao exercício a campo de alta intensidade e baixa duração. Os dados são apresentados como média \pm epm nos momentos Basal e imediatamente após o exercício. Antes os equinos foram tratados com acupuntura por 20 min durante 10 semanas nos pontos VG1, VG20, C7 e B52 (ACUP) e não tratados (CTL). Não houve diferença significativa entre os grupos. As variáveis estudadas foram analisadas mediante o programa estatístico SPSS Versão 21 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

2.3.5 Citocinas

Na análise estatística do citocinas plasmáticas IL-1 β e IL-6, não foi detectada significância estatística nos fatores corrida, dia da corrida, ou grupo. Sendo que a IL-6 não foi detectável na maioria dos animais em todos os tempos (Figura 23).

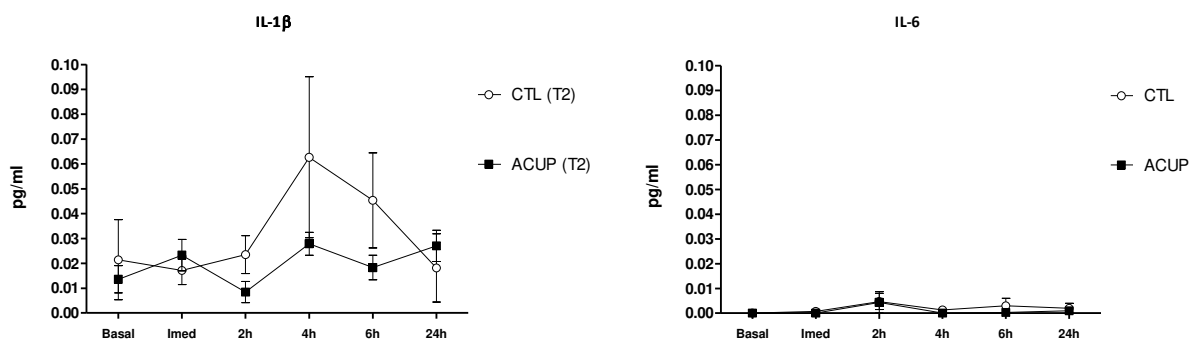


Figura 23: Efeito da acupuntura nas citocinas inflamatórias de equinos submetidos ao exercício a campo de alta intensidade e baixa duração. Os dados são apresentados como média \pm epm nos momentos Basal e imediatamente após o exercício. Antes os equinos foram tratados com acupuntura por 20 min durante 10 semanas nos pontos VG1, VG20, C7 e B52 (ACUP) e não tratados (CTL). As variáveis estudadas foram analisadas através da Anova de duas vias para medidas repetidas, mediante o programa estatístico GraphPad Prism 5.01.

2.4 DISCUSSÃO

Analisando os resultados da VFC, a estimulação nos pontos de acupuntura GV1, HT7, GV20 e BL52 foi capaz de deslocar o equilíbrio simpático-vagal, levando a um aumento da atividade parassimpática. O grupo ACUP(C2) apresentou redução acentuada do aumento induzido pelo exercício da razão LF / HF, redução da banda LF e diminuição da HF, quando comparado aos grupos CTL (C1), CTL (C2) e ACUP (C1). Sem alteração na frequência cardíaca, sugerindo um efeito notável da acupuntura sobre o equilíbrio simpátovagal. A diminuição da razão LF / HF pode ser atribuído a um aumento simultâneo do tônus vagal e diminuição do tônus simpático. É bem conhecido que a acupuntura pode regular o SNC (LI et al, 2013; VOGEL et al, 2005). Recentemente, vários estudos abordaram o efeito autonômico da estimulação de pontos de acupuntura utilizando a análise da VFC (LI et al, 2013; LEE et al, 2010; ANDERSON et al, 2012). Embora alguns estudos demonstraram que a estimulação de alguns acupontos pode aumentar a razão LF / HF (IMAI et al, 2008), outros estudos mostraram que acupuntura pode reduzir a relação LF/HF, tanto aumentando a potência HF (alta frequência) ou diminuindo o LF (baixa frequência) (ANDERSON et al, 2012). A acupuntura em pontos Sishencong, que estão localizados no vértice da cabeça, a 1cm do ponto VG20 em quatro direções, aumenta HF e diminui o LF em humanos saudáveis (WANG et al, 2002). A Acupuntura Saam (vesícula biliar "jeonggyeok"), uma acupuntura tradicional coreana que se concentra no canal da vesícula biliar para controlar o espírito e sedar a mente, diminui o LF e a razão LF / HF e aumenta a potência de HF (HWANG et al, 2011). Também foi relatado que acupuntura aplicada em IG4 e PC6 em indivíduos fatigados induz uma diminuição da potência LF e da razão LF / HF e um aumento na HF (WANG et al, 2005). A acupuntura pode restaurar o equilíbrio entre "Yin e Yang". Na terminologia da Medicina, isso pode ser traduzido como "acupuntura modula o desequilíbrio entre a atividade simpática e a parassimpática" (TAHAHASHI, 2011). Por conseguinte, a eficácia da acupuntura está baseada em evidências no seu efeito no tratamento de doenças relacionadas ao sistema nervoso, modulando o equilíbrio entre os sistemas simpático e parassimpáticos (LI et al, 2013). O efeito da acupuntura na VFC dependerá principalmente da condição do animal (por exemplo, saudável, doente, ou sob estresse) e os parâmetros da acupuntura (i.e., acupontos escolhidos e tipo de estimulação) empregados (CHUNG, 2014). Muitos estudos mostram os efeitos positivos da estimulação dos pontos de acupuntura para produzir sedação e acalmar (HWANG et, 2011).

A literatura sobre os efeitos da estimulação de acupontos em cavalos é escassa. Portanto, os acupontos utilizados neste estudo foram escolhidos baseados na indicação pela MTC para tratar distúrbios emocionais em cavalos (SHOEN, 2006). Além disso, os acupontos foram escolhidos com base na facilidade de acessibilidade, tolerância de cavalos e, quando possível, utilizando dados de literatura. O acuponto VG20, localizado no ponto mais alto da cabeça rostral à crista occipital trata convulsões e promove a tranquilização (SHOEN, 2006). O C7, localizado na face caudal do rádio, também é indicado para controlar a ansiedade e induzir quietude (SHOEN, 2006). O ponto B52 é tradicionalmente indicado transtornos reprodutivos, edema e constipação, mas também pode ser usado para controlar o medo (SHOEN, 2006). O ponto de acupuntura GV1 é indicado para dor nas costas caudal, constipação e problemas genitourinários e pode

acalmar a mente (SHOEN, 2006). Farmacopuntura com 1/10 das doses de acepromazina no GV1 produziram uma sedação leve (i.e., diminuição da excitação e reactividade a diferentes estímulos), quando comparado com a dose convencional de acepromazina (LUNA et al, 2008) em animais não perturbados (isto é, não sujeitos a estresse). Nos animais submetidos ao transporte rodoviário, foi observado redução da FC basal, sem alterar a frequência respiratória, temperatura e cortisol sérico (GODOI et al, 2014). Outro estudo mostrou que uma única estimulação nos acupontos Bai Hui, PC6, SI9, BL54, e GV14 não mudou os parâmetros da VFC em cavalos saudáveis não perturbados (JEUNE et al, 2014). Neste estudo eles destacaram alguns possíveis problemas para tal resultado como variabilidade extremamente alta nos dados da VFC; os pontos de acupuntura escolhidos; falta de estimulação acessória e o uso de cavalos clinicamente normais. Em contrapartida, um estudo recente (VILLAS-BOAS et al., 2016) mostrou que a estimulação dos pontos utilizados no presente estudo (1 VG, 7C, 52B e 20VG) foram capazes de atenuar o aumento da modulação simpática em cavalos submetidos ao teste de sobressalto. Esse efeito atenuado já foi demonstrado em vários estudos (BING et al, 1991; MEDEIROS et al, 2003), e pode estar relacionado aos efeitos inespecíficos da inserção da agulha (BIRCH et al, 2004). A inserção da agulha, um estímulo nocivo, induz contra-irritação através da ativação de um sistema descendente de inibição da dor conhecido como controle inibidor nocivo difuso (DNIC). A ativação DNIC aumenta o limiar da dor de forma dependente da intensidade e seus efeitos são de curta duração. De fato, a elevação do limiar da dor não prevê o desfecho clínico quando a analgesia não é o objetivo do tratamento (CARLSSON, 2002).

Ao analisar os parâmetros Hematócrito, Glicose e Lactato, foi observado que houve aumento significativo imediatamente após o exercício nos dois grupos (CTL e ACUP), tanto na corrida 1 (antes do tratamento) quanto na corrida 2 (depois do tratamento). No entanto, não houve diferença entre os grupos em nenhum momento.

O aumento do hematócrito, segundo Seeherman e colaboradores (1990), é importante porque previne a queda da concentração de oxigênio sanguíneo durante o exercício intenso. A capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue é um dos fatores limitantes para o condicionamento atlético. Essa característica é maximizada pelo aumento total da massa eritrocitária, havendo uma relação bem definida entre o estado atlético e o volume total de eritrócitos em humanos e equinos (HODGSON & ROSE, 1994a). No entanto, o aumento excessivo do hematócrito provocado pelo aumento da viscosidade sanguínea poderia causar redução da perfusão capilar e diminuição do aporte de O₂ às células, com prejuízo para o desempenho desportivo (PERSSON et al, 1967). Corroborando com este fato, Muñoz et al (1997) mostraram que equinos com menores valores de hematócrito durante esforço máximo foram considerados animais de melhor desempenho. Dessa forma hematócrito é considerado índice de desempenho válido por alguns autores, porém, a maioria dos autores baseiam-se em índices de lactatemia e frequência cardíaca (MUÑOZ et al., 1997).

No presente estudo, a acupuntura não foi capaz de influenciar os valores de hematócrito após o exercício, como também observado por Angeli e colaboradores (2008) que avaliaram o desempenho de 18 cavalos de corrida após três semanas de tratamento utilizando nos pontos Bai Hui, VB 27, E30 e B/P13, considerados utilizados empiricamente como pontos capazes de melhorar a performance de equinos atletas (BOSCH, 1999). No entanto, a estimulação de pontos específicos como B17 e B/P6 é

capaz de promover o aumento do hematócrito (FLEMING, 2001). Entretanto, estes pontos não foram utilizados no presente estudo, porque não foram considerados como pontos tranquilizantes e anti-estresse.

Embora os resultados não tenham mostrado diferença significativa nos níveis de lactato e glicose plasmáticos, devemos considerar que os animais tratados (ACUP T2) apresentaram concentrações de lactato mais baixas que os demais grupos, mostrando uma tendência do efeito da acupuntura nesse parâmetro. Cavalos bem treinados e melhor adaptados apresentam concentrações de lactato mais baixas após a realização de exercício sub-máximo do que cavalos não-treinados, sendo um bom indicador de desempenho (ROSE et al., 1983). Dessa forma, embora a diminuição dos valores de lactato não tenham sido estatisticamente significantes, esse resultado pode ser clinicamente importante.

Recentes estudos têm mostrado que a acupuntura afeta os valores de lactato e glicose no sangue. Rizzo e colaboradores (2017) estudaram o efeito da acupuntura nos parâmetros hematológicos de cavalos de corrida após transporte e exercício físico, e observaram que o tratamento provocou níveis mais elevados de glicose e mais baixos de lactato quando comparados ao controle durante todo período de monitorização. Esses autores sugerem que a prática da acupuntura influencia o metabolismo energético e a via bioquímica da glicose, provavelmente, modificando a percepção psicológica do animal de uma condição estressante e modulando os sistemas de controle neural e endócrino, sugerindo que a acupuntura tem um efeito benéfico sobre várias respostas fisiológicas adaptativas de cavalos de puro-sangue para estressores como transporte rodoviário e exercício físico.

Em relação ao Cortisol, os resultados mostram que houve aumento significativo trinta minutos após o exercício nos dois grupos (CTL e ACUP), tanto na corrida 1 (antes do tratamento) quanto na corrida 2 (depois do tratamento). No entanto, não houve diferença entre os grupos em nenhum momento. Outros estudos não conseguiram mostrar essa redução ou inibição da elevação dos níveis de cortisol (GUIMARÃES et al., 1997; ANGELI & LUNA, 2008; GODOY, 2014). Os resultados do presente estudo corroboram com Angeli & Luna (2008) que mostraram que não houve diferença significativa nos níveis de cortisol de equinos submetidos a corrida, quando tratados com aquapuntura. Em contraste, estudos anteriores mostraram efeitos da acupuntura na prevenção do aumento dos níveis de cortisol nos 30 minutos após o exercício (LUNA & TAYLOR, 1998), após modelo experimental de sobressalto (VILLAS-BOAS et al., 2016), após transporte rodoviário e exercício físico (RIZZO, 2017). Outros estudos demonstraram que a acupuntura pode reduzir o aumento induzido pelo estresse no cortisol (KNARDAHL, 1998; LIAO, 1980; PARK, 2014; HAN, 1999, AKIMOTO et al., 2003). O mecanismo de ação da acupuntura tem sido associado ao bloqueio da ativação HPA induzida pelo estresse (ESHKEVARI, 2012; ESHKEVARI, 2013, LEE, 2004, KIM, 2009). A eletroacupuntura (EA) nos pontos de acupuntura HT3-PC6 atenuou significativamente a expressão de c-fos induzida pela imobilização na porção parvocelular do Núcleo Paraventricular de Hipotálamo (LEE, 2004). A AE no ponto de acupuntura E36 diminuiu a elevação induzida pelo estresse nos hormônios periféricos (hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e cortisol), níveis de hormônio liberador de corticotropina (CRH) e mRNA do neuropeptídeo adrenal (NPY) (ESHKEVARI, 2013). Este mecanismo pode explicar, pelo menos em parte, o efeito da acupuntura na

prevenção dos efeitos deletérios dos níveis cronicamente elevados de corticosteróides, embora não tenhamos observado no presente estudo.

As citocinas inflamatórias IL-1 β foram extremamente baixas em todos os tempos e grupos não apresentando diferença significativa e as IL-6 não foram detectáveis. Dessa forma não foi possível avaliar o efeito da acupuntura nas citocinas, haja vista que estas não foram detectáveis em nenhum momento, inclusive no momento basal em todos os grupos. Uma hipótese é que a detecção tenha sido prejudicada pela escolha do tipo da amostra, como discutido no capítulo anterior. As análises foram realizadas de amostras de plasma. Medições das concentrações plasmáticas de citocinas são difíceis pois há uma variedade de fatores, incluindo baixas concentrações no sangue (LIBURT, 2010). O sangue não é um tecido específico para as concentrações de citocinas, como as citocinas possuem uma meia-vida curta, sua atuação tende a se restringir a sua própria célula produtora ou a sua periferia imediata (ação parácrina). Medições das concentrações plasmáticas de citocinas são difíceis pois há uma variedade de fatores, incluindo baixas concentrações no sangue (LIBURT, 2010).

Embora no presente estudo não tenha sido possível avaliar o efeito da acupuntura nas citocinas inflamatórias, alguns estudos conseguiram mostrar o seu efeito. Chen e colaboradores sugerem que eletroacupuntura pode participar na regulação de processos inflamatórios e modular a expressão gênica da IL-6 (CHEN et al, 2003). Lu e colaboradores (2016) investigaram o efeito da acupuntura sobre a atividade comportamental e nas citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α) em um modelo de estresse crônico de depressão em ratos, onde a expressão de mRNA de citocina foi detectada no hipocampo e córtex pré-frontal por reações em cadeia de polimerase de transcrição reversa (RT-PCR) e o conteúdo de citocinas no soro cerebral e sérico foi medido por ensaio imunoenzimático (ELISA). Esses autores sugeriram que a acupuntura inibe a inflamação no cérebro e sangue periférico em ratos cronicamente estressados. Estudos anteriores mostraram que a acupuntura atenuou o comportamento do tipo depressivo ao regular a função do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (WANG et al, 2015), modulando o metabolismo do triptofano-cinurenina e a neuroatividade dopaminérgica no cérebro (KWON et al, 2012), aumentando a expressão do neuropeptídeo Y na amígdala e no hipocampo, e revertendo atrofia glial no hipocampo (LIU et al, 2011). O hipocampo e o córtex pré-frontal são regiões cerebrais vulneráveis ao estresse e à inflamação e profundamente afetadas em pacientes com depressão (MACQUEEN, 2011).

Em geral, os estudos que utilizam protocolos que se assemelham à prática clínica usual são mais propensos a obter melhores resultados (ANDERSON et al, 2012). De fato, o uso clínico da acupuntura normalmente inclui 4 a 10 pontos de acupuntura (ou até mais) dados em cada uma das seis (ou mesmo mais) sessões, seguindo um protocolo individualizado de pontos após um diagnóstico pela MTC. No entanto, uma grande parte das pesquisas científicas com acupuntura realizadas tanto em animais quanto em humanos (EHRlich E HABER (1992); GUIMARÃES et al. (1997); YANG et al., 2002); AKIMOTO et al. (2003); CAIN et al (2003); ANGELI et al (2008), GODOY et al (2014), LU et al (2016), RIZZO et al (2017)) utilizam um protocolo único e padronizado de tratamento, e não um protocolo individualizado. Quanto se utiliza protocolos padronizados é possível avaliar o efeito específico desses pontos no tratamento de uma determinada patologia. No entanto, a desvantagem do utilização de

um protocolo único e padronizado é que o indivíduo não é tratado de forma completa, ou seja, outros problemas que possam estar influenciando ou o desequilíbrio desse problema, o que pela MTC é conhecido como "raiz", podem não estar sendo tratados, podendo prejudicar de certa forma o resultado.

Portanto, o fato de no presente estudo não ter sido observado melhora significativa na maioria dos parâmetros analisados pode ser devido a utilização de um protocolo único de tratamento. Dessa forma, se faz necessário mais estudos com protocolos diferentes ou individualizados e/ou a utilização de outras técnicas para melhor avaliar o efeito da acupuntura em diversas condições estressantes no cavalo atlético.

2.5 CONCLUSÃO

- O tratamento com uma sessão semanal de acupuntura durante 10 semanas nos pontos VG1, VG20, C7 e B52 em equinos submetidos ao exercício a campo de alta intensidade e baixa duração reduziu significativamente o aumento da razão LF / HF e da banda LF e a diminuição da HF induzido pelo exercício, sugerindo um efeito notável da acupuntura sobre o equilíbrio simpátovagal.
- A acupuntura não foi capaz de influenciar outros parâmetros estudados (hematócrito, lactato, glicose, cortisol)
- Não foi possível avaliar o efeito da acupuntura nas citocinas inflamatórias.

CAPÍTULO III

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS AO MODELO EXPERIMENTAL DE SOBRESSALTO EM EQUINOS ATLETAS DAS MODALIDADES ADESTRAMENTO, ENDURO E PÓLO.

RESUMO

Confinamento, transporte, competições, treinamento inadequado, alterações na alimentação, manejo incorreto, descanso insuficiente entre competições são alguns fatores que podem desencadear estresse podendo interferir no bem-estar e no desempenho de um cavalo atleta. O manejo específico para determinada modalidade associada a raça, pode tornar esses animais mais ou menos reativos ao estresse. Modelos de sobressalto têm sido utilizados para avaliar a reatividade ao estresse em diferentes espécies. Dessa forma, o presente estudo teve o objetivo de comparar a reatividade ao estresse em cavalos atletas das modalidades equestres: Pólo, Enduro e Adestramento) através da avaliação das respostas endócrinas (análise de Cortisol), autonômicas (análise de Variabilidade da Frequência Cardíaca) e comportamentais induzidas por um modelo experimental de sobressalto. Foram utilizados 24 equinos, machos e fêmeas, pesando entre 450 - 550 kg, pertencentes a três modalidades equestres: Pólo (raça PSI), Adestramento (raça Brasileiro de Hipismo) e Enduro (raça Puro Sangue Árabe) submetidos ao modelo experimental de sobressalto através da abertura abrupta de um guarda-chuva. Os resultados mostraram que cavalos de enduro apresentaram resposta autonômica induzida pelo sobressalto significativamente menos intensa que cavalos de Polo e Adestramento (menor razão LF/HF no momento do sobressalto), paradoxalmente cavalos de Enduro possuem níveis de cortisol em resposta ao sobressalto mais altos que cavalos de Pólo. Não houve diferença entre as modalidades na resposta comportamental após o sobressalto, no entanto cavalos de Pólo apresentam níveis basais de cortisol significativamente mais altos que as demais modalidades e não variaram seus níveis de cortisol em resposta ao estresse. Dessa forma, podemos concluir as modalidades equestres de Adestramento, Polo e enduro apresentam reatividade ao estresse distintas.

Palavras-chave: estresse, bem-estar animal, cortisol, variabilidade da frequência cardíaca, comportamento

3.1 INTRODUÇÃO

Há inúmeros fatores que permeiam a vida de um animal de competição servindo como fontes estressoras. Uma das características do equino é sua necessidade de liberdade e de pastejar a maior parte de seu tempo. Os cavalos atletas estão, invariavelmente, submetidos ao confinamento sendo que, em criação extensiva, os equinos passam 60% de seu tempo pastando, enquanto que em confinamento passam apenas 10% que passam recebendo alimentação pré-determinada. O convívio social restrito, a intensidade de atividade física e baixa ingestão de volumoso são também fatores de estresse importantes para esses animais (HOUPY, 1993; MCGREEVY, 2004). Além disso, outros fatores como relação intensa entre o cavalo e seus tratadores ou cavaleiros, o ambiente, o transporte por longas distâncias, as condições ambientais adversas, as competições, o treinamento inadequado, as alterações na alimentação, o manejo incorreto, e o descanso insuficiente entre eventos também devem ser considerados como fatores de estresse (HOUPY, 1993; MCGREEVY, 2004). Todos esses fatores podem interferir no bem-estar e no desempenho de um cavalo atleta e requerem atenção especial (TEIXEIRA, 2002).

Os cavalos estão mais ou menos vocacionados para diferentes tipos de modalidades. Neste sentido, no Enduro é mais frequente encontrarmos o cavalo Árabe; no adestramento, o Brasileiro de Hipismo; no Pólo, o Puro Sangue Inglês. Além disso, em cada modalidade o manejo é diferente, variando a intensidade de treinamento, a rotina de competições, o tipo de confinamento. Portanto, o manejo específico para determinada modalidade associada a raça, pode tornar esses animais mais ou menos reativos ao estresse.

Os cavalos respondem de maneira diferente frente a uma mesma situação e o que pode ser estressante para um, pode não ser para outro. Três fatores principais determinam se uma situação vai ser percebida como estressante. A primeira é a experiência individual. As situações novas são muitas vezes percebidas como sendo ameaçadoras ou estressante e os cavalos parecem temer o desconhecido. Em segundo lugar, é a sensação de controle que o indivíduo tem numa situação. Estar fora de controle é um estressor importante para alguns tipos de personalidade. Em terceiro lugar é se o estímulo induz dor ou alterações metabólicas (como o exercício físico, inflamação/infecção) (CAYADO ET AL, 2006).

Moberg (2000) propõem um modelo para compreensão do estresse em toda espécie animal, seja nos seres humanos ou em animais. O modelo de estresse animal desenvolvido sugere uma resposta biológica ao estresse a partir de três estágios gerais:

- 1º) O reconhecimento de um estímulo estressante
- 2º) A defesa biológica contra o estímulo estressante
- 3º) As consequências da resposta de estresse

A resposta ao estresse começa com a percepção de uma ameaça potencial (estímulo estressante) a homeostase pelo SNC. Uma vez que o SNC percebe uma ameaça, o organismo desenvolve uma resposta biológica ou defesa que consiste numa combinação de três respostas gerais de defesas biológicas: resposta comportamental, resposta do sistema nervoso autônomo e resposta do sistema neuro-endócrino

Este conjunto de respostas do organismo causa mudanças biológicas significantes no animal para aliviar a ameaça percebida. A intensidade da resposta é o que determina se o animal está sofrendo de estresse ou é meramente experimentado um episódio breve em sua vida sem nenhum impacto significativo ao seu bem-estar.

A resposta de sobressalto é um reflexo defensivo induzido por estímulos externos, inesperados e intensos, que geralmente se caracteriza por piscar de olhos, um movimento de cabeça, contração abdominal ou flexão de membros (Cook et al., 1991). Embora vários tipos de estímulos (acústicos, tácteis ou visuais) possam induzir o susto em animais e seres humanos, a resposta acústica de sobressalto tem sido mais investigada (KOCH, 1999). Além da resposta comportamental, o sobressalto induz alterações autonômicas e endócrinas, levando ao aumento da frequência cardíaca, da pressão arterial e nos níveis de glicocorticoides. Neste sentido, o aumento da FC induzida pelo sobressalto é consistentemente observado em diferentes animais experimentais e é mediado pelas modulações simpática e parassimpática do sistema nervoso autônomo (BRADLEY et al, 1990; LANG, et al, 1990). Por outro lado, o aumento induzido pelo sobressalto nos níveis de corticosterona não é observado em todas situações experimentais ou em todas linhagens de ratos (KOCH, 1999). Desta forma, um estudo combinado das respostas comportamentais, autonômicas e endócrinas é importante para uma melhor compreensão resposta de sobressalto, uma vez que a magnitude das respostas autonômicas, endócrinas e comportamentais a um estímulo nem sempre estão correlacionadas (VILLAS-BOAS et al, 2016).

O estudo da resposta de sobressalto é considerada uma abordagem comprovada, confiável e precisa para investigar os mecanismos encefálico de aprendizagem, memória, emoções e controle de movimentos, uma vez que a magnitude da resposta de sobressalto pode ser aumentada ou diminuída por uma variedade de condições patológicas e manipulações experimentais (KOCH, 1999). Por exemplo, mudanças na homeostase emocional e perceptual, isto é, eventos aversivos condicionados e incondicionados, podem aumentar a magnitude da resposta de sobressalto (BRADLEY et al, 1990; LANG et al, 1990). Enquanto que eventos prazerosos podem atenuá-la (FRIEMEL et al., 2014, SCHMID et al., 1995 e LANG et al., 1990).

Embora a resposta de sobressalto seja frequentemente observada em cavalos, poucos estudos têm explorado-a como uma ferramenta de análise. As reações de sobressalto em equinos têm interesse especial, pois podem ser influenciados por diferentes manipulações, sendo uma ferramenta útil para medir o estresse e avaliação de bem-estar. Reações intensas à novidade e ao isolamento social pode estar associado existência de uma característica geral de "medo" no cavalo (LANSADE, BOUISSOU & ERHARD 2008). Reações de medo excessivo pode representar um risco para os animais e as pessoas. Considerando o número e gravidade de acidentes, a equitação é considerada um esporte perigoso, e as respostas de sobressalto dos cavalos durante as provas equestres são uma das principais causas de acidentes neste esporte (KEELING et al., 2009). Além disso, reações de medo exagerada também têm sido associados com deficiente capacidade de aprendizagem em cavalos (HEIRD et al. 1986).

Diferentes tipos de estímulos têm sido usados para produzir sobressalto em cavalos e estudar as respostas de estresse em equinos, como a pressão física,

estímulo sonoro (chocalho de moedas num metal) (HOLLAND, 1996) ou estímulos visuais (exposição repentina a objetos novos) (REDONDO et al., 2009; VISSER et al., 2002; NICOL et al., 2005; GÓRECKA et al., 2007; CHRISTENSEN et al., 2010, VILLAS-BOAS, 2015; VILLAS-BOAS, 2016). A abertura do guarda-chuva tem sido utilizada de diferentes formas. Lansade e colaboradores utilizaram a abertura do guarda-chuva enquanto os cavalos estavam comendo para avaliar a influência da “personalidade de medo” e o efeito do isolamento social na reatividade emocional (Lansade et al., 2008; Lansade et al., 2012). Outros autores utilizaram a abertura do guarda-chuva enquanto os cavalos estavam caminhando para avaliar a influência da lecitina de soja e da dieta de óleo de milho sobre o comportamento dos cavalos (Holland et al., 1996). Mais recentemente, Villas-Boas e colaboradores caracterizaram as repostas comportamentais, autonômicas e endócrinas de equinos submetidos a um modelo de sobressalto simples, fácil de replicar e seguro, onde um guarda-chuva colorido foi repentinamente aberto próximo a garupa no animal por uma pessoa escondida atrás de uma pequena parede. Neste estudo as repostas autonômicas foram avaliadas pela análise da variabilidade da frequência cardíaca através da análise espectral utilizando a transformada Rápida de Fourier em segmentos “ultra-curtos” (Villas-Boas et al., 2016). O mesmo método foi utilizado para demonstrar que uma única sessão de acupuntura antes do sobressalto pode alterar o balanço simpato-vagal, reduzindo o aumento do LF/HF induzido pelo sobressalto (Villas-Boas et al., 2015).

Portanto, o presente estudo tem o objetivo de comparar respostas endócrinas (análise de Cortisol), autonômicas (análise de Variabilidade da Frequência Cardíaca) e comportamentais induzidas pelo modelo experimental de sobressalto em cavalos atletas de diferentes modalidades equestres (Pólo, Enduro e Adestramento).

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 24 equinos, machos (9) e fêmeas (15), pesando entre 450 - 550 kg, pertencentes a três modalidades equestres:

- Cavalos de Pólo provenientes do Itanhangá Golf Clube (Barra da Tijuca, Rio de Janeiro, RJ), com idade entre 6 e 8 anos, da raça PSI e meio sangue PSI entre 450 - 550 kg (n=9).
- Cavalos de Adestramento provenientes da Escola de Equitação do Exército (Vila Militar, Deodoro, Rio de Janeiro, RJ), com idade entre 6 e 8 anos, da raça Brasileiro de Hipismo pesando entre 450 - 550 kg (n=6).
- Cavalos de Enduro provenientes do Haras Lorien (São José do Vale do Rio Preto, RJ) com idade entre 6 e 12 anos, da raça Puro Sangue Árabe pesando entre 400 - 500 kg (n=9).

Todos os animais utilizados no trabalho são cavalos atletas e considerados saudáveis ao exame clínico do médico veterinário responsável. Todos os animais possuem acesso livre a água (água de rede) e alimentação balanceada (concentrado e volumoso). No entanto, manejo, confinamento, alimentação, protocolo e intensidade de treinamento variam de acordo com a modalidade, descritas a seguir:

- Cavalos de Adestramento: Baias com dimensões de 3m x 3m, que permitem o contato visual entre os animais e possuem cama de maravalha. Acesso restrito a piquetes.
- Cavalos de Pólo: Baias com dimensões de 4m x 3m, que permitem o contato visual entre os animais e possuem cama de maravalha. Acesso restrito a piquetes.
- Cavalos de Enduro: Os animais ficam a maior parte do tempo soltos em piquetes com plantio de Coast-cross. Baias com dimensões de 4m x 3m, que permitem o contato visual entre os animais e possuem cama de maravalha.

Todos os procedimentos foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biologia da UFRRJ (**CEUA/IB/UFRRJ**) (nº 16/2015) e estão de acordo com as normas internacionais de uso de animais em pesquisa.

Protocolo experimental

Com os animais ainda em suas respectivas baias foram realizadas coletas de sangue da veia jugular. Em seguida foi colocado o frequencímetro cardíaco (Polar Equine™) ao redor do tórax e ativado. Após a realização de todas as coletas, os animais permaneceram por 20 minutos sem manipulação. Em seguida cada animal foi levado individualmente para um picadeiro onde foi submetido ao teste de sobressalto através da abertura de um guarda-chuva. Neste teste, cada o animal entrou no picadeiro conduzido pelo cabresto por uma pessoa com a qual já era familiarizado,

contornou a pista e foi posicionado num ponto pré-determinado, de costas para a mureta que contorna pista. Quando o animal apresentou-se aparentemente tranquilo e desatento, um guarda-chuva foi aberto repentinamente por de trás da mureta a uma distância de aproximadamente 1,5m da garupa do animal. A pessoa responsável pela abertura do guarda-chuva ficou escondida atrás da mureta, sem que o animal pudesse observá-lo (figura 24). Dessa forma, o estímulo foi abrupto e inesperado. A posição do guarda-chuva forma um ângulo de aproximadamente 45 graus com a cauda do animal, possibilitando o objeto ficar dentro do campo de visão. Uma vez aberto, o guarda-chuva foi girado por um período de 120 s. Após este tempo, os equinos permaneceram no picadeiro, presos pelo cabresto por mais 3 minutos para a análise comportamental. O comportamento de cada animal durante o experimento foi gravado em vídeo, para análise do teste de reatividade. Após esse período, animal foi levado para sua baia, onde foram feitas coleta de sangue aos 30 e 60 minutos pós-estímulo.

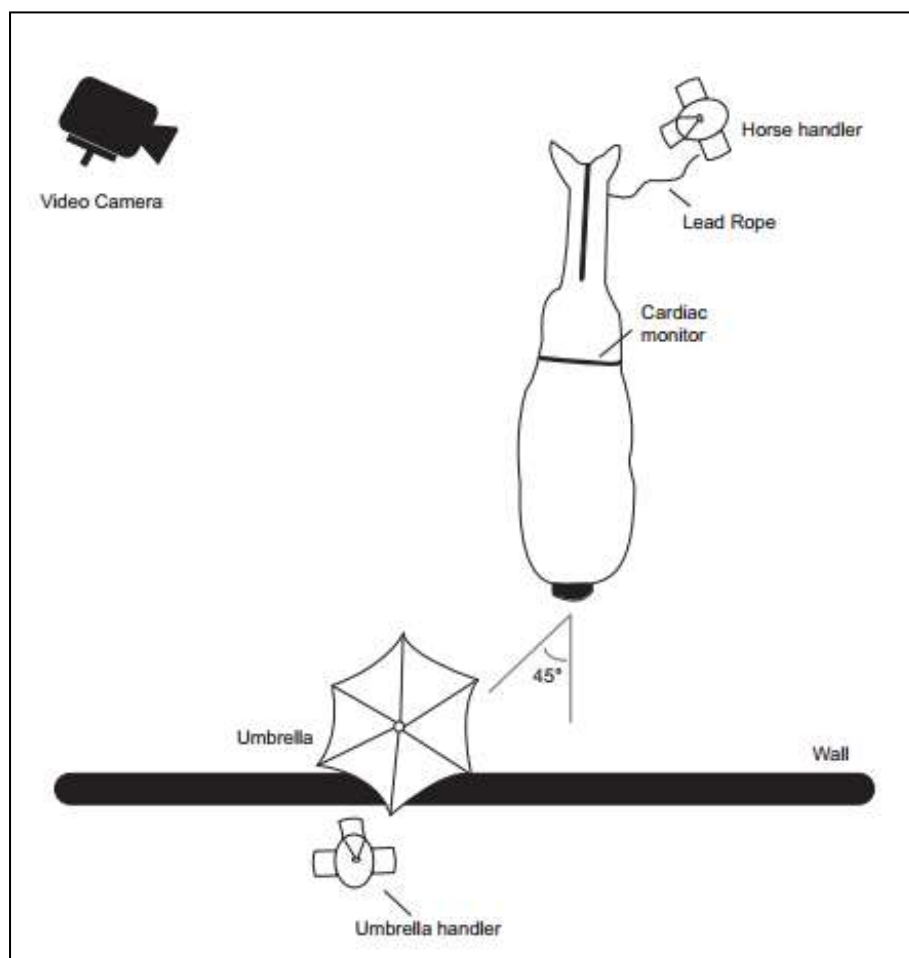


FIGURA 24: Esquema ilustrando o posicionamento do cavalo e do guarda-chuva no Modelo Experimental de Sobressalto (VILLAS-BOAS, 2016)

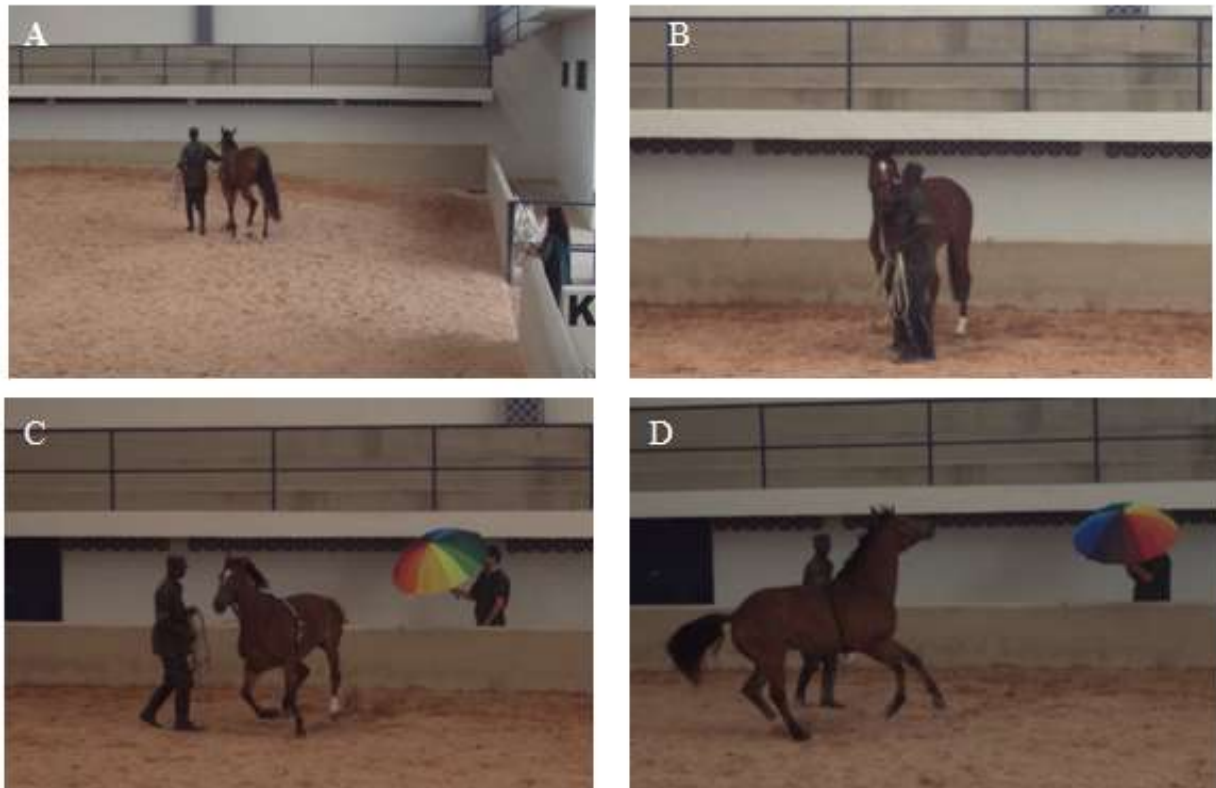


Figura 25: Foto sequenciada do modelo experimental de estresse agudo em equinos (através da abertura abrupta de um guarda-chuva). Em A: entrada do cavalo no picadeiro conduzido por um soldado. Em B: posicionamento do cavalo, conforme marcação pré-determinada. Em C e D: Reação do cavalo a abertura do guarda-chuva.

O protocolo experimental está esquematizado abaixo:

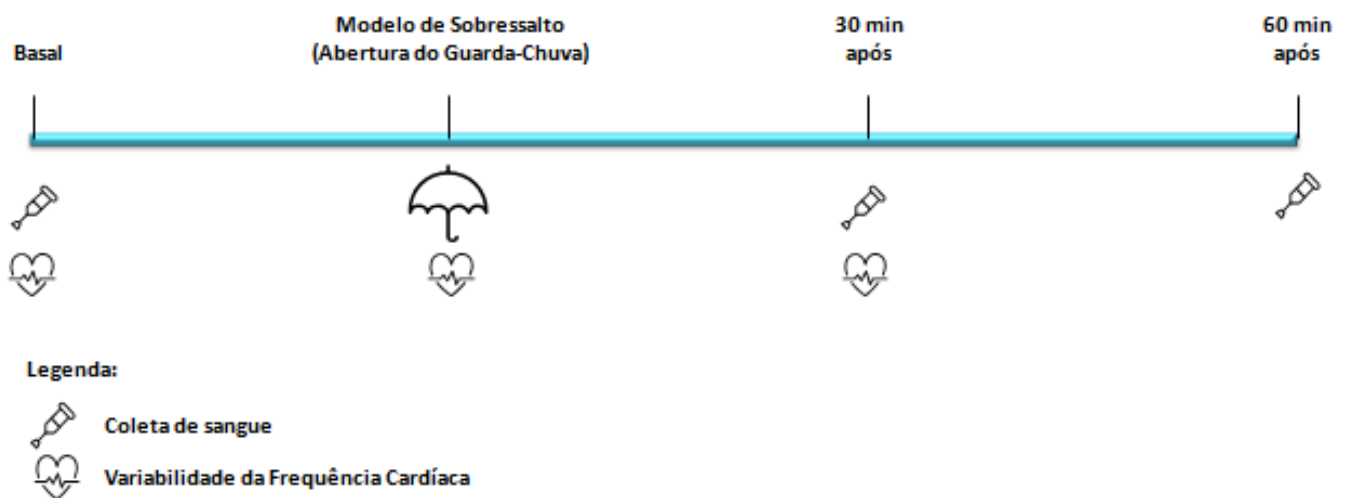


Figura 26: Esquema do protocolo do modelo experimental de sobressalto em equinos.

Uso de Frequencímetros e Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca

Os intervalos RR dos animais foram registrados durante todo o tempo do experimento por um frequencímetro, RS 800 (Polar Equine®). Em cada animal foi colocado uma faixa torácica com elétrodos para coleta dos intervalos RR, de maneira que um eletrodo foi colocado na região precordial, no torax abaixo do codilho esquerdo, outro eletrodo próximo a cernelha na região torácica. A região da pele em contato com os elétrodos foi molhada abundantemente com uma solução preparada de água e shampoo neutro para garantir a condução dos impulsos elétricos. O transmissor do sistema capta os sinais e envia-os para o relógio do equipamento, que armazena estes dados. Após o termino de cada experimento, os dados armazenados no relógio foram enviados para o programa Polar Pro Trainer Equine por meio de uma interface de emissão de infravermelhos, para análise espectral da VFC.

Os dados armazenados pelo programa Polar Protrainer 5 foram enviados para o programa Microsoft Office Excel 2007 sendo gerada uma coluna de valores de intervalos RR em milisegundos (ms), no qual foi realizada a correção de alguns artefatos através da substituição dos valores de intervalos RR discrepantes pela média dos valores dos dois intervalos RR anteriores e dos dois posteriores (VON BORREL et al., 2007). Series de intervalo cardíaco dos momentos basal, sobressalto e Após 30 min foram selecionados os momentos basais e 30 minutos após o exercício para serem analisados.

Os segmentos com os valores do intervalo RR foram exportados em arquivo de texto (TXT) para o programa CardioSeries v2.4 que gera uma página com os valores dos parâmetros da análise da VFC no domínio da frequência e no domínio do tempo, de cada segmento. Foi utilizada a Transformada Rápida de Fourier (FFT) para realizar a análise da VFC no domínio da frequência a partir da qual se obteve a razão entre os componentes frequenciais LF e HF. Essa razão permite identificar o balanço entre a ativação simpática e parassimpática nos momentos selecionados. Os valores das variáveis utilizadas pelo programa HRV analysis foram padronizados da seguinte forma: LF 0,01 – 0,07; HF – 0,07 – 0,5; taxa de interpolação = 4 e pontos no domínio da frequência = 256.

Maiores detalhes da análise da VFC no capítulo 1.

Coletas de sangue

As coletas de sangue foram realizadas através punção da veia jugular. As amostras foram acondicionadas sob refrigeração e ao final do experimento foram centrifugadas na velocidade 3200 RPM por 5 minutos e os soros foram estocados em freezer a -20°C.

Análise de Cortisol

As amostras foram coletas nos momentos basal, 30 min e 60 min após o exercício. As amostras foram acondicionadas sob refrigeração e ao final do experimento foram centrifugadas na velocidade 3200 RPM por 5 minutos e os soros foram estocados em freezer a -20°C.

As análises hormonais foram realizadas no Laboratório de Neuroendocrinologia Comportamental do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ pela técnica de radioimunoensaio (RIE). Todos os ensaios/dosagens foram realizados em duplicata. Após descongelamento das amostras à temperatura ambiente e numeração dos tubos, foi pipetado em duplicata, 25µL de diferentes concentrações padrões de cortisol do kit (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 3; 10; 30; 100 µg/dl) nos tubos, adicionando-se 25µL dos soros testes e em seguida testados e posteriormente adicionado 1,0 ml de cortisol em todos os tubos. Os tubos foram incubados em banho-maria por 45 minutos a 37°C +/- 1°C sendo feita em seguida decantação e secagem de todos utilizando um papel absorvente.

A contagem foi realizada em um contador gama calibrado para iodo radiativo (I125) da marca Wallac ®. Após as leituras, foi confeccionado o gráfico da curva padrão de acordo com as instruções do kit e os valores de cortisol das amostras testadas foram calculados a partir dos valores de radioatividade obtidos individualmente em relação aos valores da curva padrão. Os cálculos dos valores testes apresentados em µg/dl foram realizados através do programa Graph Prism 5.0. Para a manutenção da confiabilidade do teste, todos os valores deveriam estar dentro dos valores da curva padrão, não podendo ser considerados os valores fora da curva.

Análise Comportamental

Os animais foram filmados por meio de uma câmera Panasonic SDR H20 posicionado a 20 metros de distância dos equinos. Os arquivos de vídeo foram analisados através do programa de uso livre Image J.

O tempo foi calculado através da análise quadro-a-quadro do filme, sabendo-se a o padrão da filmagem foi 25 quadros por segundo.

As variáveis obtidas foram:

- (1) Tempo de Reação, tempo entre a realização do modelo de estresse e a resposta do cavalo (em segundos). Obtido a partir do aparecimento do primeiro ponto do guarda-chuva até o primeiro movimento de orelhas em direção ao guarda-chuva (REDONDO et al., 2009).
- (2) Tempo de Resposta, tempo total gasto no movimento em resposta a abertura do guarda-chuva (em segundos), foi obtido a partir do primeiro movimento das orelhas até a parada do animal com a cabeça em direção ao guarda-chuva, após deslocamento de fuga (REDONDO et al., 2009)..

Análises Estatísticas

As variáveis da VFC e cortisol foram analisadas pela ANOVA de duas vias para medidas repetidas (General Linear Model do programa SPSS), quando significativas foram comparadas pelo Teste de Bonferroni. Na análise dos valores de LF, HF e cortisol foram utilizadas como co-variáveis os valores basais uma vez que estes se mostraram visualmente diferentes entre os grupos. As reações comportamentais foram analisadas pela ANOVA de uma via. As análises estatísticas foram realizadas através do programa SPSS Versão 21 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) utilizando intervalo

de confiança de 95% e probabilidade de 5%. Os gráficos foram construídos utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (Software GraphPad).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca

O sobressalto produziu um aumento significativo na FC média em todos os grupos analisados, sem haver diferença significativa entre os grupos (fator Tempo na ANOVA de duas vias para medidas repetidas Wilks` Lambda =0.147; $F_{(2, 16)} = 46,527$, $p < 0,001$). Além disso, foi observado o retorno aos valores de FC média no momento após 30 min. Não houve diferença significativa nos fatores Interação e grupo (Figura 27A).

O sobressalto também produziu um aumento significativo na razão LF/HF (fator tempo: Wilks` Lambda =0.297; $F_{(2, 17)} = 20.107$, $p < 0,001$), no entanto as modalidades equestres apresentaram respostas diferenciadas ao sobressalto (fator grupo: $F_{(2, 18)} = 4.730$, $p < 0.001$; fator interação: Wilks` Lambda =0.275; $F_{(4, 34)} = 7.705$, $p < 0,001$). A razão LF/HF no momento do sobressalto de cavalos de Enduro é significativamente menor que de cavalos de Pólo (Bonferroni test). Em cavalos de Enduro, o sobressalto produz apenas um pequeno aumento na razão LF/HF, em contraste com os animais de Pólo e Adestramento onde o sobressalto induz aumento significativos na razão LF/HF (Figura 27B).

Como os valores basais de LF e HF foram visualmente diferentes entre os grupos, na análise estatística os valores basais foram utilizados como co-variável. Neste caso, o sobressalto também produziu um aumento significativo no LF (fator tempo x co-variada HFbasal: Wilks` Lambda =0.641; $F_{(2, 17)} = 9.403$, $p = 0.002$) e uma redução significativa da HF (fator tempo x co-variada LFbasal: Wilks` Lambda =0.460; $F_{(2, 16)} = 4.776$, $p = 0.023$), e as três modalidades equestres apresentaram respostas semelhantes ao sobressalto. No momento do basal de cavalos de Enduro o LF é significativamente menor e o HF significativamente menor que de cavalos de Pólo (teste de Bonferroni, figura 27C e D).

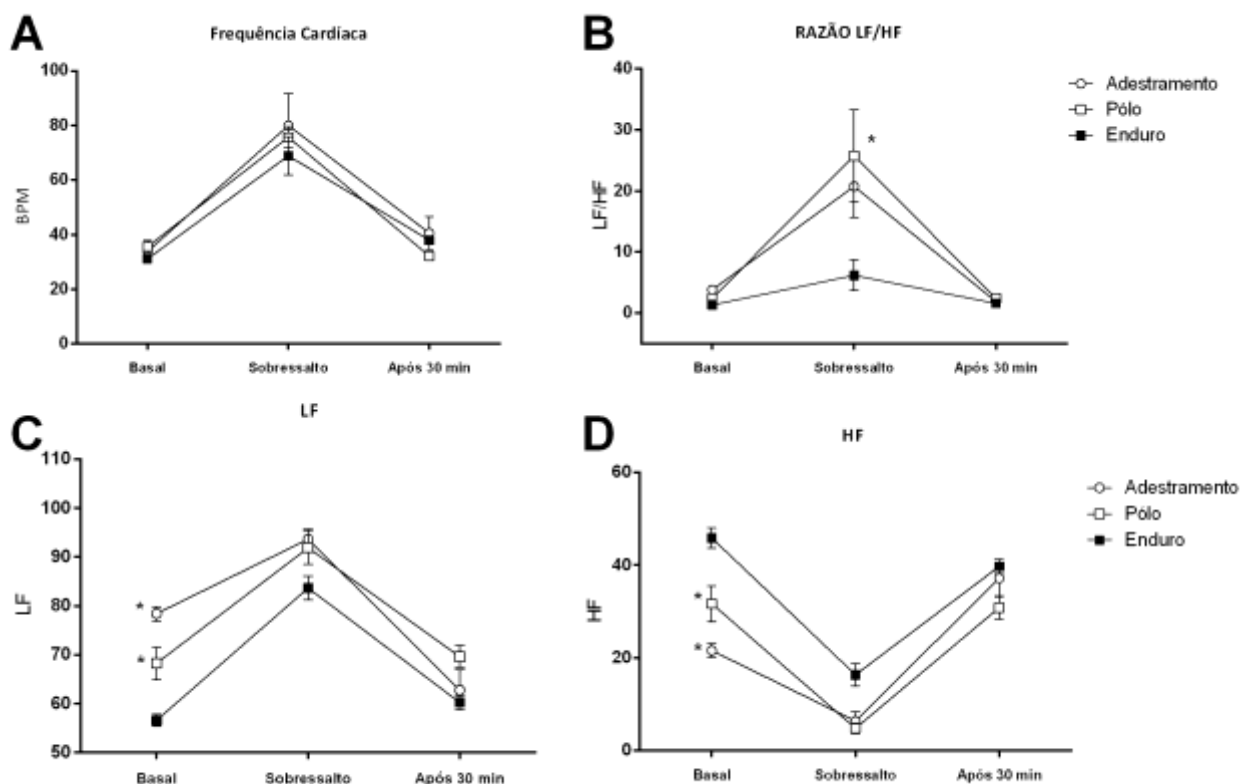


Figura 27: Parâmetros Variabilidade da Frequência Cardíaca em resposta ao modelo de sobressalto em equinos das modalidade Pólo, Adestramento e Enduro. Os dados são apresentados como média \pm epm nos momentos Basal, Sobressalto e Após 30min. (A), Frequência Cardíaca Média, (B) razão LF/HF, (C) componente de baixa frequência LF e (D) componente de alta frequência HF. *indica diferença significativa em relação ao grupo Enduro no momento analisado.

3.3.2 Análise do Cortisol

Na análise dos níveis de cortisol sérico, também foi utilizado os valores basais como co-variável, e o sobressalto aumentou os níveis de cortisol (fator tempo x co-variada cortisol basal: Wilks` Lambda =0.427; $F_{(2, 18)} = 12.089$, $p < 0.001$) e os grupos apresentam resposta diferenciada ao sobressalto (fator interação: Wilks` Lambda =0.426; $F_{(4, 36)} = 4.791$, $p = 0.003$). Os animais de Pólo apresentaram níveis de cortisol basal mais altos que os demais grupos (Bonferroni test), e não variaram seus níveis cortisol em resposta ao sobressalto. No momento sobressalto, os animais de Enduro tiveram níveis de cortisol mais altos que o animais de Pólo (Bonferroni test) (figura 28).

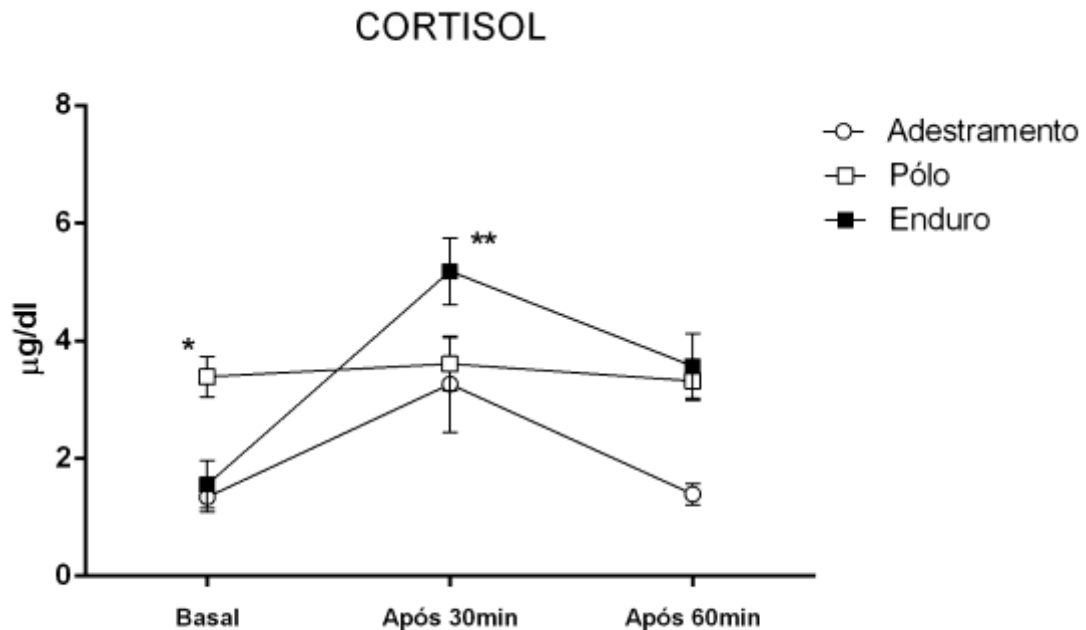


Figura 28: Níveis de cortisol em resposta ao modelo de sobressalto em equinos das modalidade Pólo, Adestramento e Enduro. Os dados são apresentados como média \pm epm nos momentos Basal, 30 min e 30min após o sobressalto. *indica diferença significativa do grupo Pólo em relação ao demais grupos, e ** indica diferença significativa em relação ao grupo Pólo no momento analisado.

3.3.3 Análise do Comportamento: Teste de Reatividade

Foi observado resposta comportamental significativa em todos os animais que participaram do experimento. No entanto não houve diferença significativa entre as modalidades (Anova de 1 via não detectou diferença significativa entre os grupos em nenhum dos parâmetros analisados (tempo de reação ($p = 0.2913$) (Figura 29A), tempo de resposta ($p = 0.0692$) (Figura 29 B).

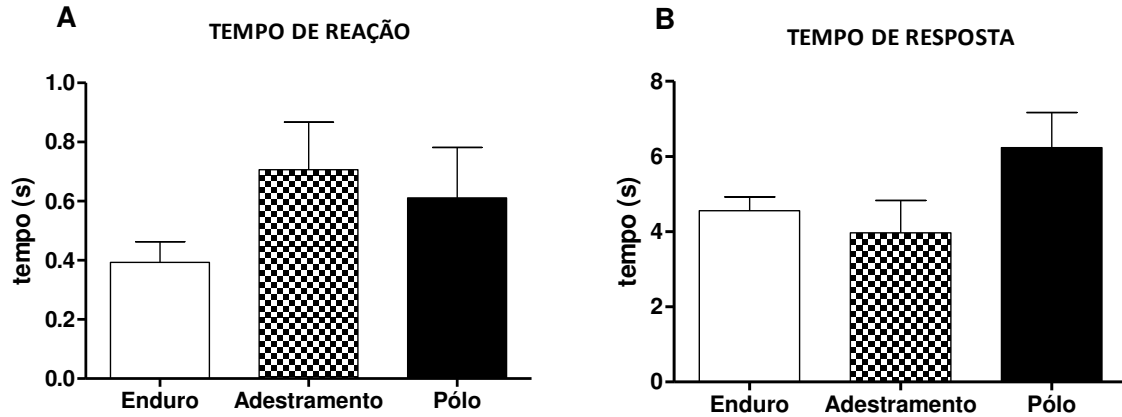


Figura 29: Reação comportamental ao modelo de sobressalto de equinos das modalidades enduro, pólo e adestramento. Em A: O tempo de reação, que consiste no tempo entre a realização do modelo de estresse e a resposta do cavalo em questão de segundos. **Em B:** O tempo de resposta, que consiste no tempo total gasto no movimento em resposta a abertura do guarda-chuva em segundos. Dados apresentados como média \pm epm.

3.4 DISCUSSÃO

Nossos dados revelam que cavalos de diferentes modalidades de esporte equestre respondem de maneira diferenciada ao modelo de sobressalto. As três modalidades apresentaram resposta comportamental semelhante, mas diferiram na magnitude da ativação autonômica e nos níveis de cortisol em resposta ao sobressalto. Cavalos de enduro apresentam menor ativação autonômica e maiores níveis de cortisol em resposta ao sobressalto, enquanto que cavalos de Pólo apresentam níveis basais de cortisol mais elevados que cavalo de Enduro e adestramento e não alteram seus níveis de cortisol em resposta ao sobressalto.

A análise espectral da Variabilidade da Frequência Cardíaca evidenciou que a abertura abrupta do guarda-chuva produziu aumento significativo na razão LF/HF e na FC média em todos os grupos. Este aumento na razão LF/HF foi consequência do aumento significativo do componente de alta frequência (LF) e da diminuição significativa do componente de baixa frequência (HF). Considerando que o LF representa predomínio da atividade do sistema nervoso simpático e que HF representa exclusivamente a atividade vagal para o coração (HOSHI, 2009; VANDERLEI, 2009), pode-se concluir que houve um aumento da regulação simpática em relação a parassimpática nesse momento.

A análise espectral da VFC, tendo como parâmetro principal a razão LF/HF, permite uma determinação mais precisa da regulação funcional do SNA, em resposta ao estresse psicológico e fisiológico já que estados psicológicos podem ter um impacto no balanço simpato-vagal sem, necessariamente vir seguido de alterações na frequência cardíaca e/ou respiratória (STAUSS, 2003). Os resultados do presente estudo confirmaram o marcado desequilíbrio autonômico cardíaco tipicamente observado após o estímulo de sobressalto em outras espécies (BAUDRIE et al., 1997). Estudos iniciais propuseram que o sobressalto estaria associado a uma resposta taquicárdica pronunciada, principalmente mediada pela ativação simpática (GRAHAM, 1979). No entanto, estudos em ratos e seres humanos demonstraram que as mudanças induzidas pelo sobressalto são mediadas pela ativação simpática e parassimpática (BAUDRIE et al., 1997). Nos seres humanos, a resposta cardíaca ao sobressalto dura cerca de 70 s e é caracterizada por duas fases taquicárdicas distintas: a fase de latência curta com um pico observado 4 s após o estímulo de sobressalto; e, a fase de latência longa com um pico observado 35 s após o estímulo de sobressalto (VILA et al., 2007). Estes autores descreveram uma resposta moderada ao sobressalto caracterizada por um padrão de resposta taquicárdica-bradicárdica-taquicárdica-bradicárdica. O primeiro ciclo de resposta taquicárdica / bradicárdica é mediada principalmente pelo sistema parassimpático (inibição seguida de ativação) e o segundo ciclo de resposta taquicárdica / bradicárdica é mediada essencialmente pela modulação simpática e parassimpática trabalhando reciprocamente (VILA et al., 2007). Atualmente, a análise da VFC tem sido amplamente utilizada para avaliação da modulação autonômica cardiovascular em ambientes experimentais e clínicos (MALLIANI et al., 1991, TASK FORCE, 1996, CASTIGLIONIET et al., 2013).

No presente estudo foram utilizados série de batimento por batimento de 64 segundos para a análise da VFC. Após um estímulo de estresse mental, observa-se uma ativação combinada de ambos os sistemas simpático e parassimpático (VILA et

al., 2007). Dessa forma, o uso de séries de tempo de batimento por batimento longas para a análise da VFC poderia dificultar a avaliação distinta da modulação cardiovascular simpática e parassimpática. Poucos estudos usaram a análise de VFC para medir o estresse mental. Salahuddin e colaboradores (2007) usaram série de tempos ultracurta para análise da VFC para avaliar estresse mental em indivíduos durante um teste Stroop. A análise dos dados foi realizada usando séries temporais com um comprimento variando de 10 s a 150 s e estes autores sugeriram que segmentos menores que 50 podiam ser usados de forma confiável para monitorar as respostas autonômicas cardíacas, estímulo estressional tomental (SALAHUDDIN et al., 2007). No presente estudo, utilizaram-se segmentos curtos de 64 s para análise de VFC para satisfazer os requisitos para a técnica de Transformada Rápida de Forrier (FFT), isto é, os segmentos devem ser suficientemente longos para permitir a quantificação de componentes de baixa frequência. Em estudo realizado anteriormente mostrou que as mudanças induzidas por indução na modulação autonômica cardíaca não puderam ser observadas usando 128 segmentos, mas foram claramente observadas quando a análise da VFC foi realizada usando segmentos de 64 s (VILLAS-BOAS et al, 2016). Outro aspecto metodológico importante dos estudos de VFC em cavalos é a faixa de bandas de frequência utilizada na análise espectral. A faixa LF: 0,01-0,07 / HF: 0,07-0,50 foi escolhido porque foi capaz de mostrar um aumento na relação LF / HF induzida pelo sobressalto com dados menos variáveis do que as outras configurações. Portanto, o uso de segmentos curtos (64 s) com faixas de frequência de 0,01 a 0,07 (LF) e 0,07 a 0,50 (HF) parece ser útil na detecção de estresse mental em cavalos (VILLAS-BOAS, 2016).

Em relação a comparação da resposta de sobressalto entre cavalos de diferentes modalidades, o presente estudo mostrou que cavalos de enduro apresentaram a razão LF/HF em resposta ao sobressalto significativamente mais baixas que cavalos de Pólo. Esse resultado sugere que os cavalos de enduro tiveram um menor impacto no balanço simpato-vagal no momento do sobressalto. Devido ao um aumento significativamente menor do componente de alta frequência (LF) e da diminuição significativamente menor do componente de baixa frequência (HF) ou seja houve um menor aumento da regulação simpática em relação a parassimpática. Talvez isso possa ser explicado pelo fato de que cavalos de algumas modalidades hípicas, como é o caso dos cavalos de enduro, não são treinados apenas em pistas e dessa forma são submetidos a diversos tipos de estímulos que podem produzir sobressalto, como trânsito de carros, motos e bicicletas, encostas íngremes, e encontros com outros animais (MATSUURA, 2010). Cavalos são animais essencialmente nervosos, característica que pode ser relacionada a história destes animais como presas; desta forma o encontro de algo estranho no caminho pode assustá-los e fazê-los mostrar comportamentos de esquiva (MATSUURA, 2010). Outro ponto importante é o fato dos cavalos de enduro ficarem a maior parte de seu tempo soltos juntos em piquetes, além de experimentarem experiências novas a todo instante possuem o convívio social. Estudos anteriores mostraram que o isolamento social pode influenciar a reatividade emocional após a aplicação de um estímulo de sobressalto (LANSADE, 2012; GOREKA, 2007).

O nível de cortisol é considerado um dos principais parâmetros para se avaliar níveis de estresse em humanos e animais, constituindo uma evidência da ativação do

Eixo HHA, um dos principais sistemas acionados em situações de estresse. Concentrações de cortisol plasmático tem sido freqüentemente utilizado para caracterizar as respostas de estresse dos cavalos (ALEXANDER et al., 1988; MARTINEZ et al, 1988; MAL et al, 1991; DICKSON, 1996; TEIXEIRA e PADUA, 2002; REDONDO, 2009; CAYADO, 2006; RIZZO, 2017).

Nossos resultados mostram que modelo experimental de sobressalto foi capaz de aumentar o níveis de cortisol sérico 30 minutos após o estímulo. No entanto, os cavalos de Pólo mostraram níveis de cortisol basal significativamente maiores que os grupos Enduro e Adestramento e não alteram os níveis de cortisol após o sobressalto. Este perfil da resposta de cortisol de animais de Pólo pode ser indicativo de estresse crônico ou ser apenas uma característica da raça. O estilo de vida caracterizado por manejo, confinamento, intensidade de treinamento e frequência de competições e a natureza mais “agressiva” do esporte Pólo podem indicar níveis maiores de estresse que as demais modalidades. No entanto, valores de cortisol basal elevados podem ser característica da raça, podendo ser considerado fisiológico. Cavalos da raça Standartbreed e cavalos Islandeses variam significativamente nos níveis de cortisol basal (Söder et al., 2012).

Com a finalidade então de verificar se o valor alto de cortisol basal é uma característica racial, foi realizada a comparação entre o cortisol basal dos animais pertencentes as modalidades enduro, adestramento e pólo que possuem raças distintas, respectivamente, Puro Sangue Árabe, Puro Sangue Inglês e Brasileiro de Hipismo, incluindo o cortisol basal de cavalos de corrida da Puro Sangue Inglês (animais pertencentes ao experimento 1). Os resultados mostraram que os cavalos de pólo possuem cortisol basal significativamente mais altos que os cavalos das outras três modalidades (Figura 30 no Anexo). É importante ressaltar que cavalos de pólo e de corrida possuem a mesma raça. Esse resultado reforça a idéia de que os cavalos de Pólo são cronicamente estressados. No entanto, para confirmar essa idéia de cavalos de pólo são cronicamente estressados devido a altos valores de cortisol basal, serão necessários estudos futuros utilizando a dosagem de metabólitos corticais fecais. Nas fezes há uma grande quantidade de hormônios esteróides, dentre eles, os glicocorticóides, como o cortisol. Além disso, na amostra fecal, ao contrário da amostra sanguínea, há níveis de metabólitos hormonais de períodos longos, refletindo assim em um mínimo de oscilações e confusão entre a dinâmica secretória normal e a resposta fisiológica é improvável (MONTEIRO, 2006).

Nossos dados também mostram que os cavalos de Pólo não variaram seus níveis de cortisol após o sobressalto, o que pode estar relacionado ao fato que valores basais destes animais já serem altos. Além disso, nossos resultados mostraram que cavalos de Enduro apresentam níveis mais elevados de cortisol em resposta ao estresse que cavalos de Pólo, indicando que cavalos de Enduro apresentam maior ativação do eixo HPA que os cavalos de Pólo. Como foi dito anteriormente estas variações podem estar relacionadas tanto ao estilo de vida quanto a raça dos animais.

Estudos na literatura mostram que as respostas de estresse variam muito entre as espécies animais. Parker et al. (2011) mostraram aumento dos níveis de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e cortisol em macacos submetidos a estímulo acústico (PARKER et al., 2011). Além disso, diferentes respostas são observadas dentro das espécies. Após o sobressalto, os níveis de corticosterona foram aumentados em ratos

Lewis / N, mas foi observado um aumento de 2 vezes em ratos Sprague-Dawley e um aumento de 5 vezes em ratos F344 / N (GLOWAET, 1992). Desmecht et al. (1996) compararam as concentrações plasmáticas de cortisol em animais competindo em diferentes modalidades (hipismo clássico, concurso completo de equitação, corrida de trote, turfe e enduro). A modalidade esportiva afetou tanto os valores de cortisol plasmático pré-prova, quanto pós-prova. CAYADO e colaboradores (2010) compararam níveis de estresse de cavalos de salto, adestramento e cavalos não atletas (controle) e observaram que níveis plasmáticos de cortisol de cavalos de salto não diferiram do basal ao atingir a pista (ambiente novo), enquanto eram elevados em cavalos de adestramento. O que indica ativação do eixo HPA pelo estresse psicológico, sugerindo que cavalos de adestramento são mais sensíveis a uma vasta gama de estressores potenciais, incluindo transporte, ambiente novo ou ameaçador. Nesse estudo os autores sugerem que os cavalos de salto podem ser mais experientes ao transporte e/ou adaptar-se a novos ambientes, devido ao maior número de competições de salto do que de adestramento. Dessa forma, a exposição à novidade tem menor impacto nestes animais (CAYADO et al., 2010).

Em relação ao manejo e confinamento, Buonora e colaboradores (2004) quando compararam cavalos confinados de semi-confinados observaram que embora não tenha havido diferença estatística entre os grupos estudados, as concentrações séricas de cortisol foram mais elevadas nas amostras colhidas dos animais do grupo confinado, ressaltando que este hormônio é um importante indicador de estresse, os animais mantidos semi-confinados apresentavam uma ligeira vantagem. Contribuindo ainda para reforçar a idéia de como o manejo pode influenciar o nível de estresse, animais confinados apresentam maior incidência de lesões gástricas, que se manifestam principalmente em situações de estresse (BUONORA et al., 2004).

O modelo experimental de sobressalto utilizado no presente estudo, proposto por Villas-Boas e colaboradores (2016) foi capaz de produzir resposta comportamental em todos os animais. As respostas fisiológicas induzidas pelo modelo experimental de sobressalto, na qual o indivíduo é apresentado a uma situação nova, vêm sendo estudadas por diversos autores (VISSER et al., 2001; NICOL et al., 2005; VISSER et al., 2008; CHRISTENSEN et al., 2010, VILLAS-BOAS, 2015; VILLAS-BOAS, 2016). A resposta comportamental foi caracterizada por reação de sobressalto e fuga que são indicativas de resposta de estresse agudo (REDONDO et al., 2010). No entanto, os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos tanto em relação ao tempo de reação e resposta quanto em relação a distância percorrida, indicando que o estilo de vida associado a raça não foi capaz de alterar ou atenuar a reação de sobressalto e fuga dos animais quando submetidos ao sobressalto.

No presente estudo combinamos a análise das respostas autonômicas, endócrinas e comportamentais para avaliar a reatividade dos animais a situações de estresse. Apesar de considerar que a avaliação comportamental é uma ferramenta importante para analisar a reatividade ao estresse, quando usado sozinho, não reflete as reações complexas do indivíduo ao estímulo. E apesar de compreender que as vias neurais que medeiam as respostas comportamentais, endócrinas e autonômicas estão conectados, nossos resultados mostram que essas respostas também podem ser dissociadas.

3.5 CONCLUSÃO

- O modelo de estresse agudo de sobressalto (abertura abrupta de um guarda-chuva) produziu uma clara ativação autonômica caracterizada pelo aumento significativo na FC, razão LF/HF, na LF, uma diminuição significativa da HF, além de produzir aumento dos níveis de cortisol e reação comportamental significativa de sobressalto.
- As modalidades equestres Enduro, Pólo e Adestramento apresentaram resposta comportamental semelhante, mas diferiram na ativação autonômica e nos níveis de cortisol em resposta ao sobressalto:
 - Cavalos de enduro apresentaram um aumento na razão LF/HF significativamente menor que cavalos de Pólo e Adestramento indicando menor ativação simpática em relação a parassimpática e sugerindo que esses animais apresentam menor reatividade autonômica ao modelo de sobressalto.
 - Cavalos de Enduro apresentaram níveis de cortisol em resposta ao modelo de sobressalto mais elevados que os cavalos de Pólo.
 - Cavalos de Pólo apresentaram cortisol basal mais elevado e não variaram os níveis de cortisol em resposta ao modelo de sobressalto.
- As respostas endócrinas, autonômicas e comportamentais induzidas pelo sobressalto em cavalos atletas parecem estar dissociadas o que reforça a importância que estes parâmetros sejam analisados em conjunto para uma avaliação mais acurada da reatividade ao estresse.

4. CONCLUSÕES GERAIS

- O exercício físico de alta intensidade e curta duração foi capaz de promover alterações fisiológicas se mostrando um bom modelo de estresse físico podendo ser utilizado em pesquisas futuras para discutir a reatividade dos animais a este tipo de estresse e para buscar mecanismos que possam alterar essas respostas.
- A acupuntura tem um efeito modulador da resposta autonômica de cavalos para estressores, como o exercício físico.
- O estilo de vida dos animais caracterizado pelos diferentes tipos de manejo, confinamento, intensidade de treinamento e frequência de competições em cada modalidade pode influenciar a reatividade dos equinos a diversos estressores, como o teste de sobressalto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACHARYA, R. U.; JOSEPH, P. K.; KANNATHAI, N.; LIM, C.M.; SURI, J.S. **Heart rate variability: a review**. Med Bio Eng Comput, v.44(12), p.1031-51, 2006.
2. ADAMS, A.; KATEPALL, M. P. ; KOHLER, K.; REEDY, S. E. ; STILZ, J. P. ; VICK, M. ; FITZGERALD, B. P. ; LAWRENCE, L. M. ; HOROHOV, D, W.. **Effect of body condition, body weight and adiposity on inflammatory cytokine responses in old horses**. Vet. Immunol. Immunopathol, v. 12, p. 286–294, 2009.
3. AGELINK, M.W.; SANNER, D.; EICH, H.; PACH, J.; BERTILING, R.; LEMMER, W.; KLIESER, E.; LEHMANN, E.. **Does acupuncture influence the cardiac autonomic nervous system in patients with minor depression on anxiety disorders?** Fortschr Neurol Psychiatr, v.71, p. 141-149, 2003.
4. AIRES, M. M. Fisiologia. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.; p.830-835, 1999.
5. AKIMOTO T, NAKAHORI C, AIZAWA K, KIMURA F, FUKUBAIASHI T, KONO I. Acupuncture and responses of immunologic and endocrine markers during competition. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v.35, n.8, p. 1296-302. 2003.
6. ALEXANDER, S.L., IRVINE, C.H.G., ELLIS, M.J., DONALD, R.A. The effect of acute exercise on the secretion of corticotropin-releasing factor, arginine vasopressin, and adrenocorticotropin as measured in pituitary venous blood from the horse. **Endocrinology**, v. 128, p. 65–72. 1991.
7. ANDERSON, B. A.; NIELSEN, D.; MCKEE, A.. Jeffres, and B. Kligler, **“Acupuncture and heart rate variability: a systems level approach to understanding mechanism,”** *Explore*, v. 8, no. 2, p. 99–106, 2012.
8. ANDREWS, F. M.; GEISER, D.R.; WHITE, S.L.; WILLIAMSON, L.H.; MAYKUTH P.L.; GREEN, E.M. **Haematological and biochemical changes in horses competing in a 3 star horse trial and 3-day-event**. Equine Veterinary Journal, v. 20, p. 57-63, 1995.
9. ANGELI A.L.; LUNA S. P. L. **Aquapuncture improves metabolic capacity in Thoroughbred horses**. J Equine Vet Sci 2008, 28:525–31, 2008.
10. ANGELI, A.L.; LUNA, S.P.L.; GAROTTI, J.R.. **Aquapuntura no tratamento das síndromes equinas: há efeito sobre os valores hematológicos e de cortisol?** Ars veterinaria, Jaboticabal, SP, v.24, n.3, p. 153-160. 2008.
11. AUBERT, A.E.; SEPS, B.; BECKERS, F. **Heart rate variability in athletes**. Sports Med. v. 33(12), p.889-919, 2003.
12. BARLAS P.; ROBINSON J.; ALLEN J.; BAXTER GD. **Lack of effect of acupuncture upon signs and symptoms of delayed onset muscle soreness**. Clin Physiol, 20:449–56, 2000.
13. BARLY, W.; GEOR, R. J.; HINCHCLIFF, K. W.; KANEPS, A. J. **Equine Sport Medicine and Surgery - Basic and clinical sciences of the equine athlete**. Philadelphia: Saunders Company, 2004. p. 7, 55, 56 e 771, 2004.
14. BASELLI G.; CERUTTI S.; CIVARDI S.; LOMBARDI F.; MALLIANI A.; MERRI M.; RIZZO G. **Heart rate variability signal processing: a quantitative approach**

- as an aid to diagnosis in cardiovascular pathologies.** *Int J Biomed Comp* 20: 51-70, 1987.
15. BAUDRIE, V.; TULEN, J.H.; BLANC, J.; ELGHOZI, J.L.. **Autonomic components of the cardiovascular responses to an acoustic startle stimulus in rats.** *J. Auton. Pharmacol.* v. 17, p. 303–309, 1997.
 16. BAY-RICHTER, C.; BAY-RICHTER, S.; JANELIDZE, L.; HALLBERG, L. Changes in behaviour and cytokine expression upon a peripheral immune challenge, *Behav. Brain Res.* 222 (2011) 193–199, 2011.
 17. BELMIRO, H.; OLIVEIRA, D. V.; CAMILOTTI, C.M.. **Efeitos da acupuntura no desempenho motor de atletas.** *Conexões.* v. 11, n. 3, 2013.
 18. BERNARD, L. C., KRUPAT, E.. **Health Psychology: Biopsychosocial Factors in Health and Illness.** New York: Harcourt Brace College Publishers. 1994.
 19. BING, Z.; BING, F.; CESSÉLIN, S.; BOURGOIN, A. M.; CLOT, M. AND LE BARS, D. **“Acupuncture-like stimulation induces a heterosegmental release of Met-enkephalin-like material in the rat spinal cord,”** *Pain*, vol. 47, no. 1, pp. 71–77, 1991.
 20. BIRCH, S. et al. **What have reviews of the efficacy and safety of acupuncture told us so far?** *Journal of Alternative Complementary Med.* v. 10, n. 3, p. 468-480, 2004
 21. BLECHA, F. **Immune system response to stress.** CABI Publishing, p.111-122. 2000.
 22. BORELL, E.V; LANGBEIN, J; DESPRÉS, G; HANSEN, S; LETERRIER, C; MARCHANT-FORDE, J; MARCHANT-FORDE, R; MINERO, M; MOHR, E; PRUNIER, A; VALANCE, D; VEISSIER, I.. **Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals.** *Physiology & Behavior*, v. 92, p.293–316. 2007.
 23. BOSCH, E. V. D.; GURAY, J. Y. **Acupuncture points and meridians in the horse.** 2nd ed. Germany: Sonntag, 1999.
 24. BRADLEY, M. M.; BRADLEY, B. N. AND LANG, P. J. **“Startle reflex modification: emotion or attention?”** *Psychophysiology*, v. 27, no. 5, p. 513–522, 1990.
 25. BRIETZKE, E.; BRIETZKE, M.; SCHEINBERG, B. **Therapeutic potential of interleukin-6 antagonist in bipolar disorder.** *Med. Hypotheses*, v. 76, p. 21–23, 2011.
 26. BUONORA, G.S.; AFONSO, J.A.B.; ALMEIDA, H.B.; SILVEIRA ALVES, G.E. **Estudo da ocorrência de lesões gástricas em cavalos de vaquejada.** *Brasilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v.41, suplemento, p.263-264, 2004.
 27. CAIN, M. J. **Acupuncture diagnosis and treatment of the equine: a five element tutorial.** Kentucky: M.J.Cain Books, 2003.
 28. CALABRESE, E.J.. **Converging concepts: adaptive response, preconditioning, and the Yerkes–Dodson Law are manifestations of hormesis.** *Ageing Research Reviews*: v. 7: p. 8-20. 2008;
 29. CAMPBELL, E. H.. **Lactate-driven equine conditioning programmes.** *The Veterinary Journal*, v. 190(2), p. 199-207, 2011.

30. CAPUTO, F.; OLIVEIRA, M. F. M.; GRECO, C. C.; DENADAI, B. S. **Exercício aeróbio: Aspectos bioenergéticos, ajustes fisiológicos, fadiga e índices de desempenho.** Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano, Florianópolis, v. 11, n. 1, p. 94-102, 2009.
31. CASTIGLIONI, P.; DI RIENZO, M.; RADAELLI, A. **Effects of autonomic ganglionblockade on fractal and spectral components of blood pressure and heart rate variability in free-moving rats.** Auton. Neurosci 27. 2013.
32. CAYADO, P.; MUNOZ-ESCASSI, B.; DOMÍNGUEZ, c.; MANLEY, W.; OLABARRI, B.; SANCHEZ DE LA MUELAS, M.; CASTEJON, f.; MARANON, G.; VARA, E. **Hormone response to training and competition in athletic horses.** Equine vet. J. Suppl. v. 36, p. 274-278. 2006.
33. CHEN, J.; HUANG, C.; XIAO, D.; CHEN, H.P.; CHENG, J.S. **Expression of interleukin-6 mRNA in ischemic rat brain after electroacupuncture stimulation.** Acupunct Electrother Res.: 28(3-4): 157-66, 2003.
34. CHRISTENSEN, J.W.; ZHARKIKH, T.; CHOVAUX, E. **Object recognition and generalisation during habituation in horses.** Applied Animal Behaviour Science, v. 129, p. 83–91. 2010.
35. CHROUSOS, G.P.; LORIAUX, D.L.; GOLD, P.W. **Mechanisms of physical and emotional stress.** Adv Exp Med Bio, v.245, p. 3-11. 1988.
36. CHUNG J. W. Y.; CHUNG, V. C. M.; YAN, A.; ZHANG H. **“Effect of acupuncture on heart rate variability: a systematic review,”** Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2014, p. 19 , 2014.
37. COELHO, C. S.; GAMA, J. A. N.; LOPES, P. F. R.; SOUZA, V. R. C. **Glicemia e concentrações séricas de insulina, triglicérides e cortisol em equinos da raça Mangalarga Marchador após exercício físico.** Pesq. Vet. Bras. v. 31, n. 9, p. 756-760, 2011.
38. COOK, E.W. 3rd; HAWK, L.W. JR.; DAVIS, TL and STEVENSON, V.E.. **Affective individual differences and startle reflex modulation.** J Abnorm Psychol, v. 100 (1), p. 5-13, 1991.
39. COGGAN, A.R. Plasma glucose metabolism during exercise in humans. **Sports Medicine**, v. 11, n. 2, p. 102-124, 1991.
40. COLAHAN, P. T.; KOLLIAS-BAKERT, C; LEUTENEGGER, C. M.; JONES, J. H.. **Does training affect mRNA transciption for cytokine production in circulating leucocytes?** Equine Vet. J. Suppl. 34, p.154–158, 2002.
41. COOMBES, J.S. **Exercise-induced muscle damage, plasma cytokines, and markers of neutrophil activation.** Med. Sci. Sports Exerc. **37**, 737-745. 2005.
42. COVALESKY, M. E.; RUSSONIELLO, C. R.; MALINOWSKY, K. **Effects of show-jumping performance stress on plasma cortisol and lactate concentrations and heart rate and behavior in horses.** Journal of Equine Veterinary Science, v.12, n.4, p.315-327, 1995.
43. DARELLA, M.L. **A atividade mental segundo o modelo da Medicina Tradicional Chinesa. Dissertação.** Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção – Centro Tecnológico. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2001.
44. DESMECHT, D.; LINDEN, A.; AMORY, H.; ART, T.; LEKEUX, P. **Relationship of plasma lactate production to cortisol release following completion of**

- different types of sporting events in horses. *Veterinary Research Communications*, v.20, n.4, p.371-379, 1996.
45. DEVRIES, A.C.K.S, CRAFT, T.K.S, GLASPER, E.R, NEIGH, G.N, ALEXANDER, J.K.. **Social influences on stress responses and health.** *J. Psyneuen*, v.32, p. 587-607. 2007.
 46. DICKSON, W.M. **Endocrinologia, reprodução e lactação. Glândulas endócrinas.** In: SWENSON, M.J. *Dukes: Fisiologia dos animais domésticos.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 571-602. 1996.
 47. DOBROMYLSKYJ, P., P. A. FLECKNELL, B. D. LASCELLES, H. LIVINGSTON, P. TAYLOR, AND A. WATERMAN-PEARSON. **Pain assessment.** In: Flecknell, P.A. (eds), *Pain Manag An*, p. 53–79. W.B. Saunders, London, UK. 2000.
 48. DONOVAN, D.C.; JACKSON, C.A.; COLAHAN, P.T.; NORTON, N.; HURLEY, D.J. **Exercise-induced alterations in pro-inflammatory cytokines and prostaglandin F2 alpha in horses.** *Vet Immunol Immunopathol*, v. 118, p. 263-269, 2007.
 49. DRAEHMPAEHL, D.; ZOHMANN, A. **Acupuntura no cão e no gato – Princípios básicos e prática científica.** São Paulo: Roca, p.245. 1997.
 50. EHRLICH, D.; HABER, P.. **Influence of acupuncture on physical performance capacity and haemodynamic parameters.** *Int. Sports Med*, v.13, p.486-491. 1992.
 51. ERBER, R.; WULF, M.; AURICH, J.; ROSE-MEIERHÖFER, S.; HOFFMANN, G.; VON LEWINSKI, M.; MÖSTL E.; AURICH C. **Stress response of three-year-old horse mares to changes in husbandry system during initial equestrian training.** *J. Equine Vet. Sci.* ,33:1088–1094, 2013.
 52. ERBER, R.; WULF, M.; AURICH, J.; ROSE-MEIERHÖFER, S.; HOFFMANN, G.; VON LEWINSKI, M.; MÖSTL E.; AURICH C. **Stress response of three-year-old horse mares to changes in husbandry system during initial equestrian training.** *J. Equine Vet. Sci.* 2013,33:1p. 088–1094, 2013.
 53. ESHKEVARI, L.; ESHKEVARI, E.; PERMAUL, L. AND MULRONEY, S. E. **“Acupuncture blocks cold stress-induced increases in the hypothalamuspituitary- adrenal axis in the rat,”** *Journal of Endocrinology*, vol. 217, no. 1, p. 95–104, 2013.
 54. ESHKEVARI, L.; ESHKEVARI, R.; EGAN, D.; PHILLIPS ET A.L. **“Acupuncture at ST36 prevents chronic stress-induced increases in neuropeptide Y in rat,”** *Experimental Biology and Medicine*, vol. 237, no. 1, p. 18– 23, 2012.
 55. ESHKEVARI, L.; ESHKEVARI, R.; EGAN, D.; PHILLIPS, ET A.L. **“Acupuncture at ST36 prevents chronic stress-induced increases in neuropeptide Y in rat,”** *Experimental Biology and Medicine*, vol. 237, no. 1, p. 18– 23, 2012.
 56. EVANS, D. L.; HARRIS, R. C.; SNOW, D. H. **Correlation of Racing Performance with Blood Lactate and Heart Rate After Exercise in Thoroughbred Horses.** *Equine Veterinary Journal*, v. 25, n. 5, p. 441- 445, 1993.
 57. FERLAZZO, A.; MEDICA, P.; CRAVANA, C.; FAZIO, E. **Endocrine changes after experimental showjumping.** *Comp Exerc Phys.* 6:59–66. 2009.
 58. FERRAZ, G. C. **Respostas endócrinas, metabólicas, cardíacas e hematológicas de equinos submetidos ao exercício intenso e à**

- administração de cafeína, aminofilina e clenbuterol.** 2006. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2006.
59. FERRAZ, G. C.; D'ANGELIS, F. H. F.; TEIXEIRA-NETO, A. R.; FREITAS, E. V. V.; LACERDA-NETO, J. C.; QUEIROZ-NETO, A. **Blood lactate threshold reflects glucose responses in horses submitted to incremental exercise test.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*; v.60, n.1, p.256-259, 2008.
 60. FERRAZ, G. C.; TEIXEIRA-NETO, A. R.; PEREIRA, M. C.; LINARDI, R. L.; LACERDA-NETO, J. C.; QUEIROZ-NETO, A. **Influência do treinamento aeróbio sobre o cortisol e glicose plasmáticos em equinos.** *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.62, n.1, p.23- 29, 2010.
 61. FERRAZ, G.C.; ESCODRO, P.B.; QUEIROZ NETO, A. **Fisiologia do exercício equino: ferramenta para o desempenho atlético de cavalos atletas.** *Braz. J. Equine Med.*, v.12, p.6-8, 2007.
 62. FLEMING, P. **Diagnostic acupuncture palpation examination in the horse.** In: SHOEN, A. M. (Ed). *Veterinary acupuncture: ancient art to modern medicine.* St, Louis: Mosby, p. 433-41, 2001
 63. FOWLER, V.L.; KENNEDY, M.; MARLIN, D. **A comparison of the Monty Roberts training technique with a conventional UK technique for the initial training of riding horses.** *Anthrozoos.* v. 225, p. 302–321, 2012.
 64. FRANCI, C.R.. **Estresse: Processos adaptativos e não adaptativos.** In: ANTUNES-Rodrigues, F., et al. *Neuroendocrinologia Básica Aplicada.* 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.200-223. 2005.
 65. FRIEMEL, C.M.; ZIMMER, A. and SCHNEIDER, M. **"The CB1 receptor as an important mediator of hedonic reward processing"**, *Neuropsychopharmacology*, v. 79, p. 83-89, 2014.
 66. FREESTONE, J. F.; WOLFSHEIMER, K. J.; KAMERLING, S. G.; CHURCH, G.; HAMRA, J.; BAGWELL, C. **Exercise induced hormonal and metabolic changes in Thoroughbred horses: effects of conditioning and acepromazine.** *Equine Veterinary Journal*, v.23, n.3, p.219-223, 1991.
 67. FRY, L.D.M.; NEARY N.S.S.M.; ROCK J.S.; RYCHEL. J.K. **Acupuncture for Analgesia in Veterinary Medicine.** *Topics in Companion Animal Medicine - V.* 29, Issue 2, p. 35–42, 2014.
 68. GODOI, T. L. O; VILLAS-BOAS, J. D.; ALMEIDA, N. A. D. S.; TRIGO, P. I.; ALMEIDA, F. Q. DE; MEDEIROS, M. A. DE **"Pharmacopuncture versus acepromazine in stress responses of horses during road transport,"** *Journal of Equine Veterinary Science*, vol. 34, no. 2, pp. 294–301, 2014.
 69. GOMIDE, L. M. W.; MARINS, C. B.; OROZCO, C. A. G. et al. **Blood lactate concentrations of horses competing in the resistance phase of 3-day combined training event.** *Ciência Rural*, v.36, n.2, p.509-513, 2006.
 70. GORDON, M.E.; MCKEEVER, K.H.; BETROS, C.L.; MANSO FILHO, H.C. **Exercise-induced alterations in plasma concentrations of ghrelin, adiponectin, leptin, glucose, insulin and cortisol in horses.** *Vet. Journal.* v. 173, p. 532-540, 2007.

71. GORECKA, A.; BAKUNIAK, M. H.; CHRUSZCZEWSKI T.; JEZIELSKI, T. A. **“A note on the habituation to novelty in horses: handler effect,”** *Animal Science Papers and Reports*, vol. 25, no. 3, pp. 143–152, 2007.
72. GRAAF-ROELFSEMA, E.; KEIZER, H.A.; BREDA E.V. et al. **Hormonal responses to acute exercise, training and overtraining: A review with emphasis on the horse.** *Vet. Q.*, v.29, p.82-101, 2007.
73. GRAHAM, F.K.. **Distinguishing among orienting defense and startle reflexes.** In: Kimmel, H.D., Van Olst, E.H., Orlebeke, J.F. (Eds.), *The Orienting Reflex in Humans*. Erlbaum, New Jersey. 1979.
74. GUIMARÃES, C.M., PINGE, M.C.M., YAMAMURA, Y., MELLO L.E.A.M.. **Effects of acupuncture on behavioral, cardiovascular and hormonal responses in restraint-stressed Wistar rats.** *Braz J Med Biol Res*, v.30, n.12, p.1445-50. 1997.
75. HADA, T.; ONAKA, T.; TAKAHASHI, T.; HIRAGA, A.; YAGI, K. **Effects of novelty stress on neuroendocrine activities and running performance in thoroughbred horses.** *J Neuroendocrinol* v.15, p. 638-648, 2003.
76. Hall, B. M.. **T Cells: Soldiers and Spies-The Surveillance and Control of Effector T Cells by Regulatory T Cells.** *Clin J Am Soc Nephrol*, 2015.
77. HAN, S.H.; YOON, Y.W.; CHO, C.-J.; KIM, T.; MIN, B.I. **“Inhibitory effects of electroacupuncture on stress responses evoked by tooth-pulp stimulation in rats,”** *Physiology and Behavior*, v. 66, no. 2, p. 217–222, 1999.
78. HARMAN, J. C. **Backs, performance and acupuncture.** In: *Annual convention of the American association of equine practitioners*, v. 39, p. 337-348. 1993.
79. HEIRD, J.C.; WHITAKER, D.D.; BELL, R.W.; RAMSEY, C.B.; LOKEY, C.E.. **The effects of handling at different ages on the subsequent learning ability of 2-year-old horses.** *Appl. Anim. Behav. Sci.*, v. 15, p. 15–25, 1986.
80. HINES, M.T.; SCHOTT II, H.C.; BAYLY, W.M.; LEROUX, A.J. **Changes in lymphocytes subpopulation following prolonged exercise in horse.** In: *Annual Veterinary Medical Forum*, v. 12, p. 1016, 1994.
81. HODGSON, D. R.; ROSE, R. J. **Effects of a nine-month endurance training programme on muscle composition in the horse.** *Veterinary Record*, v.121, p. 271-274, 1987.
82. HODGSON, D. R.; ROSE, R. J. **The athletic horse: Principles and practice of equine sports medicine.** 1^a ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, p. 245-258, 1994.
83. HOLLAND, J.L.; KRONFELD, D.S.; MEACHAM, T.N.. **Behavior of horses is affected by soy lecithin and corn oil in the diet.** *J. Anim. Sci.* v. 74, p. 1252–1255, 1996.
84. HOSHI, R. A. **Variabilidade da frequência cardíaca como ferramenta de análise da função autonômica: revisão de literatura e comparação do comportamento autonômico e metabólico em recuperação pós-exercício.** *Dissertação. Unesp.* 2009.
85. HOWREN, M.B.; HOWREN, D.M.; LAMKIN, J. **Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis.** *Psychosom. Med.* v. 71, p. 171–186, 2009.

86. HWANG, D.S.; HWANG, H.; KIM, K.; SEO, J. C.; SHIN, I. H.; KIM, D. H.; AND KIM Y.S. **“Sympathomodulatory effects of Saam acupuncture on heart rate variability in night-shift-working nurses”** *Complementary Therapies in Medicine*, v. 19, supplement 1, p. S33– S40, 2011.
87. HWANG, Y. C., EGERBACHER, M. **Anatomy and classification of acupoints.** In: _____. SCHOEN, A. M. (Ed.). *Veterinary acupuncture: ancient art to modern medicine*. St. Louis: Mosby, 2001. p. 19-25.
88. HYPPÄ, S.; PÖSÖ, A. R. **Fluid electrolyte, and acid-base responses to exercise in racehorses.** *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 14, n. 1, p. 121-135, 1998
89. IMAI, K.; IMAI, H.; ARIGA, C.; CHEN, C.; MANTYH, T. N.; TAKAHASHI T. **“Effects of electroacupuncture on gastric motility and heart rate variability in conscious rats”**, *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, v. 138, no. 1-2, p. 91–98, 2008.
90. IMURA, H.; FUKATA J. I.; Mori, T.. **Cytokines and endocrine function: an interaction between the immune and neuroendocrine systems.** *Clin. Endocrinol.*, v. 35: p. 107-115, 1991.
91. JABLONSKA, E.M. et al. **Changes in some haematological and metabolic indices in young horses during the first years of jump-training.** *Equine Veterinary Journal*, v.23, n.4, p.309-311. 1991.
92. JANCZAREK, I.; KĘDZIERSKI, W.; STACHURSKA, A.; WILK, I.; KOLSTRUNG, R.; STRZELEC, K. **Autonomic nervous system activity in purebred Arabian horses evaluated according to the low frequency and high frequency spectrum versus racing performance.** *ACTA VET. BRNO*, v. 85, p. 355-362, 2016.
93. JANCZAREK, I.; STACHURSKA, A.; KĘDZIERSKI, W.; WILK, I. **Responses of horses of various breeds to a sympathetic training method.** *J. Equine Vet. Sci.* 2013,33:794–801, 2013.
94. JANG, M.H., SHIN, M.C., LEE, T.H., LIM, B.V., SHIN, M.S., MIN, B.I., CHO, S., KIM, E.H., KIM, C. J. **Acupuncture suppresses ischemia-induced increase in c-Fos expression and apoptosis in the hippocampal CA1 region gerbils.** *Neurosci. Lett.* v. 347, p. 5-8. 2003.
95. JEUNE, S. S. L.; CRYSTAL, A.; WILLIAM, S.; BRUN, O.H.; PYPEN, D.; HAJIM, E.; JAM, E.H. **Does Acupuncture Acutely Affect Heart Rate Variability in Horses?** *Journal of Equine Veterinary Science* - v. 34, Issue 9, p.1084–1090, 2014.
96. KARVELAS, B.R.; HOFFM, A.N.; ZENI, A.I. **Acute effects of acupuncture on physiological and psychological responses to cycle ergometry.** *Arch Phys Med Rehabil*, v. 77, p. 1256–9, 1996.
97. KATO, T.; OHMURA, H.; HIRAGA, A.; WADA, S.; KUWAHARA, M.; TSUBONE, H. **Changes in heart rate variability in horses during immersion in warm springwater.** *American J Vet Res*, v. 64, p. 1482-1485, 2003.
98. KEELING, L., P. JENSEN, P.. Behavioral disturbances, stress and welfare. In: Jensen, P. (eds), *The Ethology of Domestic Animals: An Introductory Text.* **CABT Publishing**, p. 79–98. 2002.

99. KEELING, L.J., JONARE, L., LANNEBORN, L.. **Investigating horse-human interactions: the effect of a nervous human.** *Vet. J*, v. 181, p. 70–71. 2009.
100. KIM Y.S. et al. **The practice of Korean medicine: an overview of clinical trials in acupuncture.** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v.2, n.3, p.325- 352, 2005.
101. KIM, H.; KIM, H.J.; PARK, S.M.; HAN, A.L. **“The effects of acupuncture stimulation at PC6 (Neiguan) on chronic mild stress-induced biochemical and behavioral responses,”** *Neuroscience Letters*, vol. 460, no. 1, pp. 56–60, 2009.
102. KIM, Y.K.; KIM, K.S.; NA, A.M.; MYINT, B.E.. **The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrinesystem in major depression,** *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*(2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.06.008>, 2015.
103. KINGSTON, J.K. **Hematologic and serum biochemical responses to exercise and training.** IN: HINCHCLIFF, K.W.; KANEPS, A.J.; GEOR, R. J. *Equine Sports Medicine and Surgery: Basic and Clinical Sciences of the Equine Athlete*, Philadelphia: W.B.Saunders. p.940-948, 2004
104. KNARDAHL, S.; ELAM, M.; OLAUSSON, B.; WALLIN, B.G. **Sympathetic nerve activity after acupuncture in humans.** *Pain*, v. 75, p. 19–25, 1998.
105. Koch, K.; A. Schmid, and H.-U. Schnitzler, **“Pleasure attenuation of startle is disrupted by lesions of the nucleus accumbens,”** *NeuroReport*, v. 7, no. 8, p. 1442–1446, 1996.
106. KOCH, M. **“The neurobiology of startle,”** *Progress in Neurobiology*, v. 59, no. 2, p. 107–128, 1999.
107. KWON, S.; KWON, B.; LEE, M.; YEOM, B.J.; SUR, M.; KIM, S.T.; KIM, H.J.; PARK, H.; LEE, D.H. **Modulatory effects of acupuncture on murine depression-like behavior following chronic systemic inflammation.** *Brain Res.* v. 1472, p. 149–160, 2012.
108. LACOMBE, V.A.; HINCHCLIFF, K.W.; TAYLOR, L.E. **Interactions of substrate availability, exercise performance, and nutrition with muscle glycogen metabolism in horses.** *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 223, n.11, p. 1576-1585, 2003
109. LANDERS, T.A. **Professional Care of the Racehorse: A Guide to Grooming, Feeding, and Handling the Equine Athlete.** Eclipse Press, Lexington, KY Low PA 1993: Autonomic nervous system function. *J Clin Neurophysiol* 10: 14-27, 2006..
110. LANG, P. J.; LANG, M. M.; BRADLEY, A.; CUTHBERT, B. N. **“Emotion, attention, and the startle reflex,”** *Psychological Review*, v. 97, no. 3, p. 377–395, 1990.
111. LANSADE, L.; LANSADE, C.; NEVEUX, A.; LEVY, F. **“A few days of social separation affects yearling horses’ response to emotional reactivity tests and enhances learning performance,”** *Behavioural Processes*, v. 91, no. 1, p. 94–102, 2012.

112. LANSADE, M.F.; BOUISSOU, A.; ERHARD, H. W. **“Fearfulness in horses: a temperament trait stable across time and situations,”** Applied Animal Behaviour Science, v. 115, no. 3-4, p. 182–200, 2008.
113. LE JEUNE, S. S.; LE JEUNE, C.; WILLIAMS, A.; PYPENDOP, B.H.; OHMURA, H.; JONES, J. H. **“Does acupuncture acutely affect heart rate variability in horses?”** Journal of Equine Veterinary Science, v. 34, no. 9, p. 1084–1090, 2014.
114. LEE, H.J.; LEE, B.; LEE, S.H.; CHOI, E.A. **“Electroacupuncture reduces stress-induced expression of c-Fos in the brain of the rat,”** American Journal of Chinese Medicine, v. 32, no. 5, p. 795– 806, 2004.
115. LEE, S.; LEE, M. S.; LEE, J.Y.; CHOI, S.W.; LEE, S.Y.; JEONG, A.; ERNST, E. **“Acupuncture and heart rate variability: a systematic review,”** Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical, v. 155, no. 1-2, p. 5–13, 2010.
116. LEKEUX, P.; ART, T.; LINDEN, A.; DESMECHT, D.; AMORY, H. **Heart rate, hematological and serum biochemical responses to show jumping.** Equine exercise physiology 3, p. 385-390, 1991.
117. LEWINSKI et al.. **Cortisol release, heart rate and heart rate variability in the horse and its rider: Different responses to training and performance.** The Veterinary Journal, v. 197, Issue 2, p. 229-232, 2013.
118. LI, Q.Q.; Li, G.X.; SHI, Q.; XU, J.; WANG, C.Z.; LIU, A.; WANG, L.P. **“Acupuncture effect and central autonomic regulation,”** Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2013, p. 6, 2013.
119. LIAO, Y.Y.; LIAO, K.; SETO, H.; SAITO, M.; FUJITA, A.; KAWAKAMI, M. **“Effects of acupuncture on adrenocortical hormone production. (II) Effect of acupuncture on the response of adrenocortical hormone production to stress,”** American Journal of Chinese Medicine, vol. 8, no. 1-2, pp. 160–166, 1980.
120. LIBURT, N.R.; ADAMS, A.A.; BETANCOURT, A.; HOROHOV, D.W.; MCKEEVER, K.H. **Exercise-induced increases in inflammatory cytokines in muscle and blood of horses.** Equine Vet. J., v. 42, p. 280-288, 2010.
121. LIMEHOUSE, J.B.; TAYLOR-LIMEHOUSE, P.A.. **Conceitos Orientais da Acupuntura.** In: SHOEN, A. M.. **Acupuntura Veterinária.** 2 ed. São Paulo:ROCA, cap.6, p.76-90. 2006.
122. LIN, J.H. et al. **Sustainable veterinary medicine for the new era. Revue scientifique et technique** (International Office of Epizootics), v. 22, n. 3, p. 949-964, 2003.
123. LINDEN, A.; ART, T.; AMORY, H.; DESMECHT, D.; LEKEUX, P. **Effect of 5 different types of exercise, transportation and ACTH administration of plasma cortisol concentration in sport horses.** Equine Exerc Physiol., v.3, p. 391–396, 1991.
124. LINDNER, M. I. **Acid-base physiology during exercise and in response to training.** In: HINCHCLIFF, K. W.; KANEPS, A. J.; GEOR, R. J. **Equine Sports Medicine and Surgery.** Philadelphia: Saunders, p. 872-897, 2004.
125. LINDNER, A. **Use of blood biochemistry for positive performance diagnosis of port horses in practice.** Revue de Médecine Vétérinaire, v. 151, p. 611-618, 2000.

126. LIU, Q.; LIU, B.; LI, H.Y.; ZHU, Y.Q.; WANG, J.; YU, G.C. **Glia atrophy in the hippocampus of chronic unpredictable stress-induced depression model rats is reversed by electroacupuncture treatment.** *J. Affect. Disord.* v. 128, p. 309–313, 2011.
127. LOFTUS, L.; MARKS, K.; JONES-MCVEY, R.; GONZALES, J.L.; FOWLER, V.L. **Monty Roberts' Public Demonstrations: Preliminary Report on the Heart Rate and Heart Rate Variability of Horses Undergoing Training during Live Audience Events.** *Animals (Basel)*. 2016 Sep, 6(9): 55, 2016 Sep.
128. LU, J.; SHAOA, R.H.; HU, L.; TU, Y.; GUO, J.Y. **Potential antiinflammatory effects of acupuncture in a chronic stress model of depression in rats.** *Neuroscience Letters*, v. 618, p. 31–38, 2016.
129. LUNA, S. P. L.; TAYLOR, P. M. 1998. **Effect of electroacupuncture on endogenous opioids, AVP, ACTH, cortisol and catecholamine concentrations measures in the cerebrospinal fluid (CSF), peripheral and pituitary effluente plasma of ponies.** In: ANNUAL INTERNATIONAL CONGRESS ON VETERINARY ACUPUNCTURE, 24., 1998, Taiwan. **Proceedings.** Taiwan, I.V.A.S., p. 172-174, 1998.
130. LUNA, S. P. L.; LUNA, A. L.; ANGELI, C. L.; FERREIRA, V.; LETTRY, A.; SCOGNAMILLO-SZABO, M. **“Comparison of pharmacopuncture, aquapuncture and acepromazine for sedation of horses,”** *Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 5, no. 3, pp. 267–272, 2008.
131. LUNA, S.P.L. **Equine opioid, endocrine and metabolic responses to anaesthesia, exercise, transport and acupuncture.** Cambridge Tese (PhD) – Universidade de Cambridge. 1993.
132. LUNA, S.P.L.; ANGELI, A.L.; FERREIRA, C.L.; LETTRY, V.; SCOGNAMILLO-SZABO, M. **Comparison of Pharmacopuncture, Aquapuncture and Acepromazine for Sedation of Horses.** *eCAM*, v. 5, n.3, p. 267–272. 2008.
133. MACIOCIA, G. **Fundamentos da medicina chinesa.** São Paulo: ROCA, p. 658. 2007.
134. MACQUEEN, G.; MACQUEEN, T. **The hippocampus in major depression: evidence for the convergence of the bench and bedside in psychiatric research,** *Mol. Psychiatry*, v. 16, p. 252–264, 2011.
135. MAL, M.E., FRIEND, T.H., LAY, D.C., VOGELSANG, S.G., JENKINS, O.C.. **Physiological responses of mares to short-term confinement and isolation.** *J. Equine Vet. Sci.*, v. 11, p. 96–102, 1991.
136. MALINOWSKI, K.; SHOCK, E.J.; ROCHELLE, P.; KEARNS, C.F.; GUIRNALDA, P.D.; MCKEEVER, K.H. **Plasma beta-endorphin, cortisol and immune responses to acute exercise are altered by age and exercise training in horses.** *Equine Vet J (Suppl)*, v. 36, p. 267–273, 2006.
137. MALLIANI, A.; PAGANI, M.; LOMBARDI, F.; CERUTTI, S.. **Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain.** *Circulation*. v. 84, p. 482–492, 1991.
138. MALM, C. **Exercise immunology: a skeletal muscle perspective.** *Exerc. Immunol. Rev.* 8, p. 16-167, 2002.

139. MANM, F.. **Acupuntura: a antiga arte chinesa de curar**, São Paulo: Hermus, p.208. 1971.
140. MARC, M.; PARVIZI, N.; ELLENDORFF, F.; KALLWEIT, E.; ELSAESSER, F. **Plasma cortisol and ACTH concentrations in the warmblood horse in response to a standardized treadmill exercise test and physiological markers for evaluation of training status**. Journal of Animal Science, v.78, n.7, p.1936-1946, 2000.
141. MARLIN, D., NANKERVIS, K. Equine Exercise Physiology. Blackwell Science, 296p. 2002. ROSE, R. J., PURDUE, R. A., HENSLEY, W. **Plasma biochemistry alterations in horses during an Endurance ride**. Equine Veterinary Journal. v. 9, p. 122–126, 1977.
142. MARQUES, M. S. Influência do exercício físico sobre os níveis de lactato plasmático e cortisol sérico em cavalos de corrida. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2002. 70p. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002.
143. MARTIN, B. B. and KLIDE, A. M.. **Laser AP for the treatment of chronic backpain in horses: stimulation of the AP points with a low-power laser**. Veterinary Surgery. v. 16, p. 106-110, 1987.
144. MARTINEZ, R., GODOY, A., NARETTO, E., WHITE, A.. **Neuroendocrine changes produced by competition stress on the Thoroughbred race horse**. Compendium of Biochemical Physiology, v. 3, p. 599–602. 1988.
145. MATSSURA, A.; TANAKA, M.; IRIMAJIRI, M.; YAMAZAKI, A.; NAKANOWATARI, T.;HODATE, K. **Heart rate variability after horse trekking in leading and following horses**. Animal Science Journal, v. 81, p. 618–621. 2010.
146. MCBRIDE, S.D.; Mills, D.S. **Psychological factors affecting equine performance**. BMC Vet Res 8: 180, 2012.
147. McGREEVY, P. **Equine behavior: a guide for veterinarians and equine scientists**. Londres. Saunders, p. 357. 2004.
148. MEDEIROS, M. A.; MEDEIROS, N.; CANTERAS, D.; SUCHECKI A.; MELLO, L. E. A. M. **“Analgesia and c-Fos expression in the PAG induced by electroacupuncture at Zusanli point in rats,”** Brain Research, vol. 973, pp. 196–204, 2003.
149. MORBEG, G.P.. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: MORBEG, G.P. & MENCH, J.A.. **The biology of animal stress: basic particples and implications for animal welfare**. CABI Publishing, p. 1-22. 2000.
150. MOYNA et al. **Lymphocyte Function and Cytokine Production During Incremental Exercise in Active and Sedentary Males and Females**. Int J Sports Med 17 (8), p. 585-591, 1996.
151. MULLER, N.; MYINT, A.M.; SCHWARZ, M.J. **Inflammatory biomarkers and depression**. Neurotox. Res, v. 19, p. 308–318, 2011.
152. MUÑOZ, A.; SANTISTEBAN, R.; RUBIO, M. D.; VIVO, R.; AGÜERA, E. I.; ESCRIBANO; B. M.; CASTEJÓN, F. M. **The use of functional indexes to evaluate fitness in andalusian horses**. Journal of Veterinary Medicine Science, v. 59, n. 9, p. 747-750, 1997.

153. MUNSTERS, C.; VISSER, K.; BROEK, V.D.J.; SLOET, V.O.M.M. **Quantifying stress in experienced and inexperienced mounted police horses, using heart rate, heart rate variability, behavior score and suitability score.** *J. Vet. Behav. Clin. Appl. Res.* 2013,8:e16–e17), 2013. (b)
154. MUNSTERS, C.; VISSER, K.; BROEK, V.D.J.; SLOET, V.O.M.M.; VAN, W.R. **The effects of transport, riot control training and night patrols on the workload and stress of mounted police horses.** *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2013,143:52–60, 2013. (a)
155. NAKATA, S.; TAKEDA, F.; KUROSAWA, M. et al. **Plasma adrenocorticotropin, cortisol and catecholamines responses to various exercises.** *Equine Vet. J.*; v.30, Suplemento, p. 570-574, 1999.
156. NICOL, C.J., BADNELL-WATERS, A.J., BICE, R., KELLAND, A., WILSON, A.D., HARRIS, P.A.. **The effects of diet and weaning method on the behaviour of young horses.** *Applied Animal Behaviour Science*, v. 95, p. 205–221. 2005.
157. NIEMAN, D.; NEHLSSEN-CANNARELLA, S.; FAGOAGA, O.; HENSON, D.; UTTER, A.; DAVIS, J.; WILLIAMS, F. AND BUTTERWORTH, D. **Influence of mode and carbohydrate on the cytokine response to heavy exertion.** *Med. Sci. Sport Exerc.* **30**, 671-678. 1998.
158. Nieman, D.C., Henson, D.A., Davis, J.M., Murphy, E., Jenkins, D.P., Gross, S.J., Carmichael, M.D., Quindry, J.C., Dumke, C.L., Utter, A.C., McAnulty, S.R., McAnulty, L.S., Triplett, N.T. and Mayer, E.P. **Quercetin's influence on exercise-induced changes in plasma cytokines and muscle and leukocyte cytokine mRNA.** *J. appl. Physiol.* 103, 1728-1735. 2007.
159. NIEMAN, D.C.; DAVIS, J.M.; BROWN, V.; HENSON, D.A.; DUMKE, C.L.; UTTER, A.; VINCI, D.M.; SMITH, J.; CARSON, J.A.; BROWN, A.; MCANULTY, S.R. AND MCANULTY, L.S. (2004) **Influence of carbohydrate ingestion on immune changes after 2 h intensive resistance training.** *J. appl. Physiol.* 96, 1292-1298. 2004.
160. NIEMAN, D.C.; DAVIS, J.M.; HENSON, D.A.; WALBERG-RANKIN, J.; SHUTE, M.; DUMKE, C.L.; UTTER, A.C.; VINCI, D.M.; CARSON, J.A.; BROWN, A.; LEE, W.J.; MCANULTY, S.R. AND MCANULTY, L.S. **Carbohydrate ingestion influences skeletal muscle cytokine mRNA and plasma cytokine levels after a 3-h run.** *J. appl. Physiol.* 94, 1917-1925. 2003.
161. NOBREGA, A.C. **The subacute effects of exercise: concept, characteristics, and clinical implications.** *Exerc Sport Sci Rev.* v.33, p. 84-7. 2005.
162. NOGUEIRA, G. P.; BARNABE, R. C. **Is the Thoroughbred race-horse under chronic stress?** Short Communication, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.30, p.1237-1239, 1997.
163. NORTHOFF, H.; BERG, A. and WEINSTOCK, C.. **Similarities and differences of the immune response to exercise and trauma: the IFN-gamma concept.** *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76, 497-504, 1998.
164. NOSZCZYK-NOWAK, A.; BOGUCKI, S.Z.. 2015: Zmienność rytmu serca (HRV) jako nowe narzędzie diagnostyczne w medycynie weterynaryjnej (**Heart rate variability (HRV) as a new diagnostic tool in veterinary medicine**, in

- Polish).** Weterynaria w praktyce 6: 46-50 Ostrowski, K., Rohde, T., Zacho, M., Asp, S. and Pedersen, B.K. (1998a) Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *J. Physiol.* v. **508**, p. 949-953. 2015.
165. PAGAN, J.D.; GEOR, R.J.; HARRIS, P.A.; HOEKSTRA, K.; GARDNER, S.; HUDSON, C.; PRINCE; **A. Effects of fat adaptation on glucose kinetics and substrate oxidation during low-intensity exercise.** *Equine Veterinary Journal*, v.34, p.33-38, 2002.
166. PALIN, K.; PALIN, R.M.; BLUTHE, R.H.; MCCUSKER, T.; LEVADE, F.; MOOS, R.; DANTZER, K.W. **The type 1 TNF receptor and its associated adapter protein FAN, are required for TNF α -induced sickness behavior.** *Psychopharmacology (Berl.)* 201, p. 549–556, 2009.
167. PARK, H. J.; PARK, Y.; CHAE, J. W.; KIM, H.; LEE, A.; CHUNG J.H. **“Effect of acupuncture on hypothalamic-pituitary-adrenal system in maternal separation rats,”** *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 31, no. 8, p. 1123–1127, 2005.
168. PEDERSEN, B.K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev.* v. 80, p.1055-81. 2000.
169. PELLEGRINOTTI, I. L. (Org.). **Performance Humana Saúde e Esporte.** Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, p. 17-23, 2004.
170. PELTOLA, M.A. **Role of editing of RR intervals in the analysis of heart rate variability,** *Front. Physiol.* v.3. p.148. 2012.
171. PERSSON, S. D. G. **On blood volume and working capacity of horses: Studies of methodology and physiological and pathological variations,** *Acta Physiological Scandinavica*, v. 19, n. 9, p. 189, 1967.
172. PERSSON, S.G.B. **Evaluation of exercise tolerance and fitness in the performance horse.** In: SNOW, D.H.; PERSSON, S.G.B.; ROSE, R.J. *Equine Exercise Physiology.* Cambridge: Granta, 1983. p. 441-457b. PETERSEN, A.M.W.; PEDERSEN, B.K.; **The anti-inflammatory effect of exercise.** *J. Appl. Physiol.*, v. 98, p. 1154-1162, 2005.
173. PICCIONE, G. et al. **Different periodicities of some haematological parameters in exercise-loaded athletic horses and sedentary horses.** *Journal Equine Science*, v.12. n.1, p.17-23, 2001.
174. PITTLER, M.H.; ERNST, E. **Effectiveness of Acupuncture in veterinary medicine: systematic review.** *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.20, n.3, p.480-488, 2006.
175. RALSTON, S.L. **Insulin and glucose regulation.** *Vet. Clin. Equine*, v. 18, p. 295-304, 2002.
176. REDONDO, A.R; CARRANZA. J; TRIGO, P. **Fat diet reduces stress and intensity of startle reaction in horses.** *Applied Animal Behaviour Science*, v. 118, p. 69-75. 2009.
177. RIETMANN, T. R.; STAUFFACHER, M.; BERNASCONI, P.; AUER, J. A.; WEISHAUPT, M. A. **The Association between Heart Rate, Heart Rate Variability, Endocrine and Behavioural Pain Measures in Horses Suffering from Laminitis.** *J. Vet. Med.* ,v. 51 A, p.218–225. 2004a.

178. RIETMANN, T.R.; STUART, A.E.A.; BERNASCONI, P.; STAUFFACHER, M.; AUER, J.A.; WEISHAUP, M.A. **Assessment of mental stress in warmblood horses: heart rate variability in comparison to heart rate and selected behavioural parameters.** J. Appl. Anim. Welf.Sci, v.88,p. 121–136. 2004b.
179. RIZZO, M.; ARFUSO, F.; GIANNETTO, C.; GIUDICE, E.; LONGO, F.; BRUSCHETT, D.; PICCIONE, G. **Acupuncture Needle Stimulation on Some Physiological Parameters After Road Transport and Physical Exercise in Horse** - Journal of Equine Veterinary Science, v. 48, 2017.
180. RIZZO, M.; ARFUSO, F.; GIANNETTO, C.; GIUDICE, E.; LONGO, F.; BRUSCHETT, D.; PICCIONE, G. **Cortisol levels and leukocyte population values in transported and exercised horses after acupuncture needle stimulation** - Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research. v. 18, p. 56-61, 2017.
181. ROSE, R.J; ALLEN, J.R.; HODGSON, D.R.; STEWART, J.H.; CHANN, W. **Responses to submaximal treadmill exercise and training in the horse: changes in haematology, arterial blood gas and acid base measurements, plasma biochemical values and heart rate.** The Veterinary Record, v. 113, n. 26/27, p. 612-618, 1983.
182. ROSE, R. J., PURDUE, R. A., HENSLEY, W. **Plasma biochemistry alterations in horses during an Endurance ride.** Equine Veterinary Journal. v. 9, p. 122–126, 1977.
183. SALAHUDDIN, L.; CHO, J.; JEONG, M.G.; KIM, D.. **Ultra short term analysis of heartrate variability for monitoring mental stress in mobile settings,** Conference proceedings: Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Conference, p. 4656–4659, 2007.
184. SCHALM, O.W. **Equine Hematology: the erythrocytes and plasma.** Equine Practice, v. 1, n. 2, p. 37-42, 1979.
185. SCHMID, A.; KOCH, M. and SCHNITZLER, H. U.. **“Conditioned pleasure attenuates the startle response in rats,”** Neurobiology of Learning and Memory, v. 64, no. 1, p. 1–3, 1995.
186. SCHMIDT, A., AURICH, C., NEUHAUSER, S., AURICH, J., MÖSTL, E., **Comparison of cortisol levels in blood plasma, saliva and faeces of horses submitted to different stressors or treated with ACTH.** IN Symposium Equitation Science, 5, Sydney, 2009, Proceeding, p. 53. 2009.
187. SCHMIDT, A.; AURICH, J.; MÖSTL, E.; MÜLLER, J.; AURICH, C. **Changes in cortisol release and heart rate and heart rate variability during the initial training of 3-year-old sport horses.** Horm. Behav. 2010,58:628–636, 2010.
188. SCHMIDT, A.; MÖSTL, E.; WEHNERT, C.; AURICH, J.; MÜLLER, J.; AURICH, C. **Cortisol release and heart rate variability in horses during road transport.** Horm. Behav. 57:209–215, 2010
189. SCHOEN, A. M., **Veterinary Acupuncture: Ancient Art to Modern Medicine,** Mosby, St. Louis, Mo, USA, 2nd edition, 2001.

190. SCHOEN, A.M.. **Acupuntura Veterinária – Da Arte Antiga à Medicina Moderna.** 2ª Ed. São Paulo. Roca. 2006.
191. SCOGNAMILLO-SZABÓ, M.V.R. et al. **Breve histórico da acupuntura veterinária no Brasil e sua prática no Estado de São Paulo.** MEDVEP – Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação, v.4, n.11, p.61-65, 2006.
192. SEEHERMAN, H.J.; MORRIS, E.; O'CALLAGHAN, M.W. **The use sports medicine techniques in evaluating the problem equine athlete.** Veterinary Clinics of North America-Equine Practice, v.6, n.1, p. 239-275. 1990.
193. SELYE, H. **A syndrome produced by diverse nocuous agents.** Nature, v. 138, p.32. 1936.
194. SIGHIERI, C.; BARAGLI, P.; VILLANI, C.; MARTELLI, F.; GATTA, D.; CIATTINI, F. **Cortisolo ed insulina plasmatici nel cavallo da endurance durante test submassimale standadizzato al treadmill.** Annali della Facolta di Medicina Veterinária di Pisa, v.49, p.335-343, 1996.
195. SIMÕES, H. G. **Respostas metabólicas e hormonais durante os testes de determinação do limiar anaeróbio individual e lactato mínimo.** Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos, 2000.
196. SNOW, D.H. et al. **Post-race blood biochemistry in Troroughbred.** In. SNOW, D.H.; PERSSON, S.G.B, R.J. (Eds.). Equine exercise physiology. p. 389-399. 1983
197. SÖDER, J; BRÖJER, J. T. and NOSTELL, K.E.A. **Interday variation and effect of transportation on indirect blood pressure measurements, plasma endothelin-1 and serum cortisol in Standardbred and Icelandic horses.**Acta Veterinaria Scandinavica, 54:37, 2012.
198. SOLIGO, M.; NORI, S. L. L.; PROTTO, V.; FLORENZANO, F., MANNI, L. **Acupuncture and neurotrophinmodulation, in Neurobiology ofAcupuncture: 111 International Review of Neurobiology, B.-Y. Zeng, K. Zhao, and F.-R. Liang, Eds.; Academic Press, London, UK, 2013. Q.-Q. Li, G.-X. Shi, Q. Xu, J. Wang, C.-Z. Liu, and L.-P. Wang, “Acupuncture effect and central autonomic regulation,” Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2013, 6 pages, 2013.**
199. STAUSS, H. M.. **Heart rate variability.** AJP- Regul. Integ. Comp. Physiol., v.285, p. R927 - R931, 2003.
200. STRELTSOVA et al.. **Effect of orange peel and black tea extracts on markers of performance and cytokine markers of inflammation in horses.** Equine and Comparative Exercise Physiology, v.3, p. 121-130, 2006.
201. Strzelec, K.; Kankofer, M.; Pietrzak, S.. **Cortisol concentration in the saliva of horses subjected to different kinds of exercise.** Acta Veterinaria Brno, 2011.
202. Suuager, J.K. et al. **Relationships between Body Condition Score and Plasma Inflammatory Cytokines, Insulin, and Lipids in a Mixed Population of Light-Breed Horses.** Journal of Veterinary Internal Medicine, v. 27, p. 157-163, 2013.

203. TAKAHASHI, T. “**Mechanism of acupuncture on neuromodulation in the gut—a review,**” *Neuromodulation: Technology at the Neural Interface*, v. 14, no. 1, p. 8–12, 2011.
204. TASK-FORCE, 1996. **Heart rate variability: standards of measurement physiological interpretation, and clinical use.** Task Force of the European Society of Cardiology the North American Society of Pacing. *Circulation* 93,1043–1065, 1996.
205. TEIXEIRA, P. P. e PADUA, J. T.. **Avaliação dos níveis de cortisol, tiroxina, triiodotironina e glicose como indicativos de estresse em cavalos puro sangue inglês de corrida, antes e após a competição.** *Ciência Animal Brasileira*, v. 3, n. 1, p. 39-48. 2002.
206. TENNENT-BROWN, B. S.. **Lactate production and measurement in critically ill horses.** *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian*, 33(12), E5, 2011.
207. TIRGOVISTE, C.I.. **Anatomic and functional particularities of skin areas used in acupuncture.** *Am J Acupunct*, v. 3, p.199-206. 1975.
208. ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, L. P. **Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses.** *Nature Reviews Neuroscience*, v.10, p. 397-409. 2009.
209. VAN BREDA, E. **A Nonnatural Head–Neck Position(*Rollkur*) During Training Results in Less Acute Stress in Elite, Trained, Dressage Horses.** *Journal of Applied Animal Welfare Science*, v. 9, issue 1, 2006.
210. VAN ERCK et al. **Evaluation of oxygen consumption during field exercise tests in Standardbred trotters.** *Equine and Comparative Exercise Physiology*, v.4, p. 43–49, 2007.
211. VANDERLEI, L. C. M., PASTRE, C.M., HOSHI, R.A., CARVALHO, T.D, GODOY, M.F. **Noções Básicas de Variabilidade da Frequência Cardíaca e sua aplicabilidade Clínica.** *Ver. Bras. Cir. Cardiovasc*, v. 24, n. 2, p. 205-217. 2009.
212. VELLUCI, S. V. **The autonomic and behavioral responses to stress.** *Stress, Stress Hormones and the Immune System*, London: Wiley, 1997. p.64-65, 1997.
213. VILA, J.; GUERRA, P.; MUNOZ, M.A.; VICO, C.; VIEDMA-DEL JESUS, M.I.; DELGADO, L.C.; PERAKAKIS, P.; KLEY, E.; MATA, J.L.; RODRIGUEZ, S.. **Cardiac defense: from attention to action.** *Int. J. Psychophysiol.* 66, 169–182, 2007.
214. VILLAS-BOAS, J. D.; DIAS, D. P. M.; MEDEIROS, M. A. “**Experimental model of startle in horses,**” in *Proceedings of the International Workshop in Neuroendocrinology*, 2016.
215. VILLAS-BOAS, J.D.; DIAS, D.P.M.; TRIGOC, P.I.; DOS SANTOS ALMEIDA, N.A.; DE ALMEIDA, F.Q.; DE MEDEIROS, M.A. **Behavioural, endocrine and cardiac autonomic responses to a model of startle in horses.** *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2015.
216. VISSER, E.K., REENEN, C.G., HOPSTER, H., SCHILDER, M.B.H., KNAAP, J.H., BARNEVELD, A., BKOHUIS, H.J.. **Quantifying aspects of young**

- horses's temperament: consistency of behavioural variable.** *Applied Animal Behaviour Science*, v. 74, p. 241–258, 2001.
217. VISSER, E.K.; VAN REENEN, C.G.; VAN DER WERF, J.T.; SCHILDER, M.B.; KNAAP, J.H.; BARNEVELD, A.; BLOKHUIS, H.J. **Heart rate and heart rate variability during a novel object test and a handling test in young horses.** *Physiol. Behav.* v. 76, p. 289–296, 2002.
 218. VOGEL, J. H. K.; BOLLING, S. F.; COSTELLO, R. B. **“Integrating complementary medicine into cardiovascular medicine: a report of the American college of cardiology foundation task force on clinical expert consensus documents (Writing Committee to Develop an Expert Consensus Document on Complementary and Integrative Medicine),”** *Journal of the American College of Cardiology*, v. 46, no. 1, p. 184–221, 2005.
 219. VON BORELL, E.; LANGBEIN, J.; DESPRÉS, G.; HANSEN, S.; LETERRIER, C.; MARCHANT-FORDE, J.; VEISSIER, I. **Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals—a review.** *Physiol Behav*, v. 92, p. 293-316, 2007.
 220. WANG, J. D.; KUO, T. B. J.; YANG, C. C. H. **“An alternative method to enhance vagal activities and suppress sympathetic activities in humans,”** *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, v. 100, no. 1-2, p. 90–95, 2002.
 221. WANG, S.J.; ZHANG, J.J.; YANG, H.Y.; F. WANG, S.T. **Acupoint specificity on acupuncture regulation of hypothalamic- pituitary-adrenal cortex axis function.** *BMC Complement Altern. Med.* 27 (2015) 87, 2015.
 222. WANG, Z. L.; WANG, C.; MAK, A. F.T.; CHOW, H. K. **“Effects of acupuncture on heart rate variability in normal subjects under fatigue and non-fatigue state,”** *European Journal of Applied Physiology*, v. 94, no. 5-6, p. 633–640, 2005.
 223. WELLHOENER, P.; BORN, J.; FEHM, H.L.; DODT, C. **Elevated resting and exercise-induced cortisol levels after mineralocorticoid receptor blockade with canrenoate in healthy humans.** *J Clin Endocrinol Metab*, v. 89, p. 5048–5052, 2004.
 224. WILK, I.; JANCZAREK, I.. **Relationship between behavior and cardiac response to round pen training.** *J Vet Behav*, v. 10, p. 231-236, 2015.
 225. WILK, I.; KĘDZIERSKI, W.; STACHURSKA, A.; JANCZAREK, I.. **Are results of Crib Opening Test connected with efficacy of training horses in a round-pen?** *Appl Anim Behav Sci*, v. 166, p. 89-97, 2015.
 226. XIE, H.; LIU, H. **Equine back pain: a tradicional chinese medical review.** *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*, Philadelphia, v. 19, p. 6-12, 1997.
 227. YAMAMURA ,Y. **Acupuntura-Tradicional :a Arte de Inserir.** Roca, São Paulo. 1993.
 228. YANG ,C. H.; LEE, B. B.; JUNG, H. S.; SHIM, I.; ROH, P. U.; GOLDEN, G. T. **“Effect of electroacupuncture on response to immobilization stress,”** *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 72, no. 4, p. 847–855, 2002.
 229. YOU, Z.; LUO, C.; ZHANG, W.; CHEN, Y.; HE, J.; ZHAO, Q.; ZUO, R.; WU, Y. **Pro- and anti-inflammatory cytokines expression in rat's brain and**

- spleen exposed to chronic mild stress: involvement in depression, Behav. Brain Res., v. 225, p. 135–141, 2011.**
230. YUN, S.J., PARK, H.J., YEOM, M.J., HAHN, D.H., LEE, H.J., LEE, E.H. **Effect of electroacupuncture on stress-induced changes in brain-derived neurotrophic factor expression in rat hippocampus. Neurosci. Lett., v. 318, p. 85-88. 2002.**

6. ANEXOS

6.1. Avaliação da diferença de cortisol basal entre as raças de equinos pertencentes a modalidades Enduro, Adestramento, Pólo e Corrida

Na análise dos níveis de cortisol sérico basal, a ANOVA de uma via para medidas repetidas detectou diferença significativa entre os grupos ($F_{(2, 41)} = 0.0026$; $p < 0.01$). O teste de comparações múltiplas de Bonferroni foi capaz de identificar diferenças entre os grupo Enduro, Adestramento, Polo e Corrida. O grupo Pólo apresentou cortisol basal significativamente mais alto que os grupos Enduro e Corrida ($p < 0.05$) e Adestramento ($P < 0,01$). Não houve diferença entre os grupos Enduro, Adestramento e Corrida.

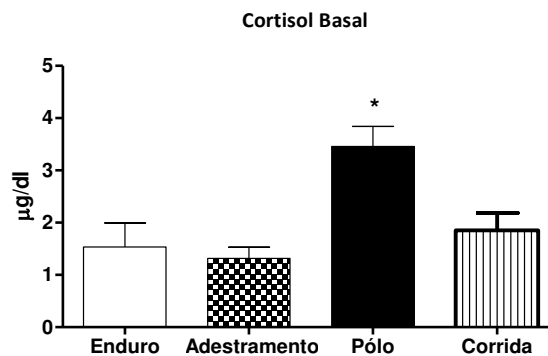


Figura 30: Cortisol basal de equinos pertencente as modalidade Enduro (raça Puro Sangue Árabe), Adestramento (Raça BH), pólo (raça PSI) e Corrida (raça PSI). Os dados são apresentados como média \pm epm nos momentos Basal , Pós 30 e Pós 60min. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos (Pólo vs Enduro e Pólo vs Corrida) e (**) indica diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos (Pólo vs Adestramento) Analisados através Anova de uma via para medidas repetidas, quando significativas foram comparadas pelo Teste de Bonferroni. As variáveis estudadas foram analisadas mediante o programa estatístico GraphPad Prism 5.01.